
**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**



***DOTTORATO DI RICERCA
IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA***

**Indirizzo: PATOLOGIA VEGETALE
XXI° CICLO**

TESI SPERIMENTALE

Uso di torbe e compost per il contenimento delle malattie telluriche

Dottorando: Dott. CATELLO PANE

Tutor: Prof. FELICE SCALA

Coordinatore: Prof. MATTEO LORITO

INDICE

INDICE

a.	RIASSUNTO	<i>pag.</i> 9
1.	INTRODUZIONE	13
1.1.	Il concetto di soppressività delle malattie telluriche	16
1.2.	I meccanismi della soppressività	19
1.3.	Utilizzo di torba e compost a scopi fitoiatrici nel settore vivaistico	25
1.4.	Dinamiche del processo di compostaggio e di colonizzazione delle comunità microbiche	34
1.5.	Scopo del lavoro di tesi	41
2.	MATERIALI E METODI	47
2.1.	Collezione di campioni di Torbe e Compost ed analisi chimiche	47
2.2.	Biosaggi per la valutazione del damping-off	48
2.3.	Valutazione della fitotossicità e della crescita fungina sugli estratti acquosi dei materiali	51
2.4.	Spettroscopia ^{13}C CPMAS e ^{31}P DPMAS NMR	52
2.5.	Misura delle attività enzimatiche	54
2.6.	Misura delle popolazioni microbiche	56
2.7.	Analisi Biolog per la determinazione dei profili metabolici delle comunità microbiche	57
2.8.	Analisi statistiche dei dati	60
3.	RISULTATI	63
3.1.	Incidenza del damping-off	64
3.2.	Valutazione della fitotossicità e della crescita	

	<i>pag.</i>
fungina sugli estratti acquosi	68
3.3. ^{13}C CPMAS NMR	71
3.4. ^{31}P PDMAS NMR	76
3.5. Popolazioni microbiche	78
3.6. Attività enzimatiche	79
3.7. BIOLOG	80
3.8. Relazioni tra i parametri misurati per ciascun ammendante organico	86
4. DISCUSSIONE	93
5. CONCLUSIONI	113
6. REFERENZE CITATE	117

RIASSUNTO

RIASSUNTO

I patogeni tellurici, che costituiscono i principali fattori limitanti la produttività degli agro-ecosistemi, sono molto spesso difficili da controllare mediante le strategie di lotta convenzionali. I compost utilizzati nel settore vivaistico come ammendanti di substrati di coltivazione a base di torba possono essere di grande utilità come metodo di lotta alternativo alle malattie.

In questo lavoro, cinque compost ottenuti da rifiuti solidi urbani (RSU), deiezioni zootecniche, residui colturali e/o industriali e materiali di potatura, sono stati miscelati alla torba e saggiati per valutarne la capacità di sopprimere il damping-off causato da *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia minor* sulla pianta ospite *Lepidium sativum*.

L'ammendamento della torba con i diversi compost ha fatto registrare una minore incidenza del damping-off per tutti e tre i patogeni inoculati. I compost risultati più efficaci nel controllo dei patogeni sono stati quelli prodotti a partire da deiezioni zootecniche, da RSU e da scarti di materiali industriali. La soppressività rilevata è risultata dipendente dalla componente biologica dei compost, essendo essa diminuita o annullata con la sterilizzazione. Il ruolo delle comunità microbiche nel contenimento delle

malattie è dimostrato anche dalla correlazione positiva tra soppressività e attività enzimatica totale (FDA) e specifica (Chitinasi e Glucanasi).

È stato ipotizzato che la microflora presente nei compost antagonizza i patogeni attraverso la competizione per le risorse energetiche e, in taluni casi, attraverso la produzione di enzimi litici. Il profilo metabolico delle comunità microbiche rilevato mediante il sistema BiologTM è un parametro in grado di quantificare il livello di fungistasi degli ammendanti organici. La soppressione delle malattie è risultata correlata con la velocità di decomposizione dei substrati e con la diversità e versatilità catabolica dei compost. La disponibilità per la microflora di molecole energetiche prontamente assimilabili come i polisaccaridi assume un significato fondamentale nel determinismo della soppressività.

La spettroscopia ¹³C CPMAS NMR ha evidenziato che il contenuto di tali composti è fondamentale per sostenere l'attività dei microrganismi benefici presenti nei compost.

Questi risultati indicano che l'applicazione di torbe miscelate a compost è una strategia potenzialmente utile nelle produzioni vegetali a basso impatto ambientale.

1. INTRODUZIONE

1. INTRODUZIONE

I patogeni tellurici che costituiscono i principali fattori limitanti la produttività degli agro-ecosistemi, sono molto spesso difficili da controllare mediante strategie di lotta convenzionali come, per esempio, l'uso di cultivar resistenti e dei fungicidi di sintesi chimica. La perdita di efficacia della lotta chimica a causa dello sviluppo di ceppi di patogeni resistenti ai fungicidi, il superamento della resistenza dell'ospite da parte delle popolazioni del patogeno (McDonald & Linde, 2002), l'impatto ambientale degli agrofarmaci, sono alcune delle ragioni che sottolineano la necessità di sviluppare nuove strategie di controllo. La messa al bando del bromuro di metile, il fumigante più utilizzato per la disinfestazione del suolo, ha aumentato ancora di più la necessità di nuovi metodi di lotta (Martin, 2003). In questo contesto, la ricerca di alternative con alta efficacia, basso costo ed impatto ambientale contenuto rappresenta una vera e propria sfida per un'agricoltura moderna in chiave eco-sostenibile. Le alternative proposte includono metodi fisici come la solarizzazione (Katan, 1996; Bonanomi *et al.*, 2008), la biofumigazione (Kirkegaard *et al.*, 2000), la disinfestazione biologica del suolo (Blok *et al.*, 2000) e l'applicazione di agenti di biocontrollo (Hoitink & Boehm, 1999; Ryckeboer, 2001) e di sostanza organica (Bailey & Lazarovits, 2003).

L'uso di ammendamenti organici come deiezioni zootecniche, sovesci (intesi come incorporazione di residui colturali nel suolo), compost e torbe sono stati proposti per il loro utilizzo in agricoltura biologica e convenzionale, al fine di migliorare la struttura e la fertilità dei suoli (Magid *et al.*, 2001; Conklin *et al.*, 2002), e ridurre l'incidenza delle malattie causate da patogeni tellurici (Litterick *et al.*, 2004; Noble & Coventry, 2005; Lazarovits, 2001).

Nel secolo scorso, l'introduzione dei fertilizzanti inorganici di sintesi, delle varietà resistenti alle malattie e dei fungicidi ha determinato la perdita del legame diretto tra ammendamenti organici e fertilità (Hoitink & Boehm, 1999). Come risultato, i materiali organici, quali i residui colturali e letame, da risorse essenziali e necessarie alla produttività dei suoli, sono passati ad essere considerati semplicemente rifiuti solidi da smaltire in altro modo. Con la riduzione degli input organici, si è registrata una continua diminuzione del contenuto di sostanza organica ed il conseguente declino della fertilità nei suoli. Inoltre è stata osservata la diffusione nei sistemi agricoli di un gran numero di malattie causate da patogeni tellurici (Zucconi, 1996; Hoitink & Boehm, 1999; Bailey & Lazarovits, 2003).

Problemi simili sono stati registrati anche per i substrati di coltivazione delle piante utilizzati, in particolare, nel settore vivaistico, per la

moltiplicazione e commercializzazione di specie orticole e/o ornamentali, e nei sistemi “fuori suolo” (Hoitink & Boehm, 1999).

Gli impatti negativi sull’ambiente dovuti alle fumigazioni del suolo ed ai fungicidi e la richiesta di prodotti agricoli più salubri hanno stimolato un rinnovato interesse per le applicazioni di sostanza organica nei processi produttivi agricoli, per la lotta ai patogeni tellurici (Lazarovits, 2001). Diversi studi hanno mostrato, infatti, che gli ammendamenti organici possono essere molto efficaci nel controllo delle malattie causate da patogeni come *Fusarium* spp. (Lewis & Papavizas, 1977; Szczech, 1999), *Phytophthora* spp. (Szczech & Smolińska, 2001), *Pythium* spp. (McKellar & Nelson, 2003; Veeken *et al.*, 2005), *Rhizoctonia solani* (Papavizas & Davey, 1960; Diab *et al.*, 2003), *Sclerotinia* spp. (Lumsden *et al.*, 1983a; Boulter *et al.*, 2002), *Sclerotium* spp. (Coventry *et al.*, 2005), *Thielaviopsis basicola* (Papavizas, 1968) e *Verticillium dahliae* (Lazarovits *et al.*, 1999).

1.1 Il concetto di soppressività delle malattie telluriche

L'incremento dell'incidenza delle malattie telluriche è indice di condizioni di inospitalità e sofferenza per le piante coltivate. Esistono suoli e matrici organiche utilizzati come substrati di coltivazione, che possiedono una importante proprietà, denominata *soppressività*. Tale caratteristica si estrinseca nell'interazione complessa pianta-patogeno, rendendo l'“ambiente” sfavorevole allo sviluppo delle malattie. L'ambiente, nel caso delle malattie telluriche, è rappresentato dal *suolo* in senso lato, (comprendendovi, cioè, anche i substrati organici) o meglio dalla *rizosfera*, definita come lo spazio in cui le radici delle piante si sviluppano e interagiscono con i microrganismi tellurici, patogeni ed antagonisti compresi. La soppressività, infatti, è la capacità di un suolo di limitare lo sviluppo di malattie fungine e batteriche (telluriche). Baker & Cook (1974) hanno definito soppressivi quei suoli nei quali il patogeno non attecchisce e non persiste, oppure, attecchisce ma causa danni molto limitati. Come per i suoli agrari, tale definizione si estende bene anche a tutte le categorie di ammendanti impiegati in agricoltura, con particolare riguardo a quelli impiegati come substrato di allevamento delle piante nel settore ortoflorovivaistico. Non a caso, la capacità mostrata da questo tipo di substrati,

di sopprimere alcune tra le più importanti malattie, rappresenta un valore aggiunto alle loro positive proprietà chimiche e fisiche.

Alcuni studiosi ritengono corretto distinguere la soppressione del patogeno, intesa come la diminuzione della capacità di crescita saprofitaria del patogeno e della sua stessa sopravvivenza, dalla soppressione della malattia, intesa come ostacolo al processo patogenetico.

Secondo Weller *et al.* (2002), esistono due tipologie di soppressività:

- La *soppressività generale*, che è riconducibile all'attività ed alla biomassa microbica totale presente nel suolo. Tale tipo di soppressività non è trasferibile tra suoli. La soppressività generale si riferisce a situazioni nelle quali diversi tipi di microrganismi presenti nel substrato di coltivazione funzionano da agenti di biocontrollo nella soppressione delle malattie (Boehm *et al.*, 1993; Hardy & Sivasithamparam, 1991). Alcuni patogeni vegetali come *Pythium* e *Phytophthora* spp. sono controllati attraverso la soppressività generale (Boehm *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1988b; Chen *et al.*, 1988a; Hardy & Sivasithamparam, 1991; Mandelbaum & Hadar, 1990). È stato riportato che una microflora totale caratterizzata da elevata biomassa ed attività può prevenire la germinazione delle spore del

patogeno e conseguentemente ridurre le potenzialità di infezione delle piante ospiti , presumibilmente attraverso microbiostasi (Chen *et al.*, 1988a; Mandelbaum & Hadar, 1990). L'elevata attività microbica determina un impoverimento di nutrienti essenziali alla sopravvivenza e moltiplicazione del patogeno (Chen *et al.*, 1988a), ma non ne determina la morte, ma solo dormienza (Chen *et al.*, 1988b; Mandelbaum & Hadar, 1990).

- La *soppressività specifica*, invece, è riconducibile all'attività di specifici gruppi di microrganismi (Hoitink *et al.*, 1991; Stone *et al.*, 2004) e, per questo, è anche trasferibile fra suoli. La soppressività specifica è più qualitativa rispetto alla precedente, basandosi su effetti specifici, di singoli individui o gruppi selezionati di microrganismi antagonisti sul patogeno, durante una particolare fase del suo ciclo vitale (Cook & Baker, 1983).

Contrariamente a quanto visto per i suoli soppressivi, esistono anche suoli in cui il processo patogenetico viene favorito dall'ambiente e la malattia si manifesta più velocemente ed in modo acuto, producendo maggiori danni alle colture. Tali suoli non-soppressivi sono detti *conducivi* (o *conduttivi*).

1.2 I meccanismi della soppressività

I suoli e gli ammendanti soppressivi, indubbiamente, devono questa loro importante proprietà ad una combinazione di fattori fisici, chimici e microbiologici. La soppressività, inoltre, dipende anche dal tipo di substrato utilizzato e dal patogeno da controllare (Boehm *et al.*, 1997; Hoitink & Boehm, 1999; El-Masry *et al.*, 2002; Boutler *et al.*, 2000;).

In relazione ai fattori biologici coinvolti nella soppressività, i substrati soppressivi, probabilmente, sono il miglior esempio in cui la microflora nativa protegge effettivamente l'organismo vegetale dall'attacco dei patogeni tellurici. La soppressività imputabile ai fattori biologici, definita anche come soppressività biologica del suolo (attività soppressiva della componente biotica residente) risulta chiara ed evidente quando l'incidenza della malattia che vi si riscontra è nettamente inferiore a quella rilevata negli stessi substrati sottoposti a trattamenti fisici del calore, che ne riducono (pastorizzazione) o eliminano (sterilizzazione) le attività biologiche (Chen *et al.*, 1987; Kuter *et al.*, 1988; Nakasaki *et al.*, 1998; van Os & van Ginkel, 2001). Inoltre, in seguito al trasferimento di parte del substrato soppressivo non sterile, in quello sterilizzato (divenuto conduttivo), la soppressività generale viene ristorata completamente. In altre parole, la soppressività

generale è determinata dalla biomassa microbica totale e dalla sua biodiversità. È, quindi, importante precisare che la soppressività non è mai imputabile ad un singolo microrganismo (Cook & Baker 1983; Mazzola, 2004). Oltre che attraverso trattamenti termici intensi (autoclave), comunemente la soppressività biologica viene eliminata anche con la sterilizzazione mediante raggi gamma. A differenza della sterilizzazione totale con il calore, la fumigazione o la pastorizzazione, riducono l'intensità dell'attività soppressiva biotica, ma non la eliminano completamente.

Nella soppressività specifica, invece, il ruolo attivo nel determinismo della soppressività da parte di specifici gruppi microbici viene confermato dal fatto che il trasferimento di una aliquota (1-10%) di substrato soppressivo in quello condutivo conferisce a quest'ultimo i caratteri del primo. Il substrato condutivo, quindi, acquista la soppressività in seguito all'aggiunta della nuova comunità microbica.

L'importanza della microflora nel determinismo della soppressività può essere dimostrata in diversi modi. Ad esempio, la misura dell'attività enzimatica idrolitica complessiva, che è una stima dell'attività microbica totale, spesso è utilizzata come indice della soppressività verso malattie dovute a *P. ultimum*, *R. solani* ed altri patogeni (Chen *et al.*, 1989a; Chen *et al.*, 1989b).

L'attività microbica totale, la biomassa, le popolazioni microbiche, i profili genetici e metabolici delle comunità microbiche residenti (Biolog), la respirazione del substrato, oltre ad altre specifiche attività enzimatiche, sono state associate alla soppressività (Chen *et al.* 1988; Tuitert *et al.*, 1998; Diab *et al.*, 2003; Noble & Coventry, 2005; Pérez-Piqueres *et al.*, 2006).

La principale causa di soppressione delle malattie dovuta ad ammendanti organici è rappresentata dall'attività biologica che si esplica attraverso l'azione dei microrganismi ivi residenti. Tali microrganismi implicati nel controllo delle malattie sono come microrganismi benefici o agenti di biocontrollo. L'attività dei microrganismi benefici all'interno della comunità microbica e la loro risposta alle riserve energetiche disponibili nei compost sono alla base del controllo delle malattie (Hoitink & Boehm, 1999). La concentrazione e la disponibilità di nutrienti e fonti di carbonio (quali carboidrati, lignina, cellulosa, chitina, lipidi, etc.) all'interno degli ammendanti organici, gioca un ruolo critico nella regolazione dell'attività di questi microrganismi (Hoitink *et al.*, 1997).

Sono stati proposti meccanismi diversi e complementari per spiegare la capacità degli ammendamenti organici di aumentare la soppressività dei substrati di coltivazione (Hoitink & Boehm, 1999; Hoitink *et al.*, 1996a; Lockwood, 1988):

1) aumento dell'attività dei microbi antagonisti (Hoitink & Boehm, 1999);

2) incremento della competizione per le risorse a discapito dei patogeni ed insorgenza della fungidistasi (Lockwood, 1990);

3) rilascio di composti fungitossici durante la decomposizione della sostanza organica (Smolińska, 2000; Tenuta & Lazarovits, 2002);

4) induzione della resistenza sistemica nelle piante ospiti (Zhang *et al.*, 1996; Pharand *et al.*, 2002).

È da sottolineare che la comunità microbica residente nella sostanza organica sopravvive in condizioni di forte pressione competitiva per i materiali organici prontamente degradabili e per i nutrienti energetici nell'ambiente tellurico (Stone *et al.*, 2004). Tipicamente, la competizione per i nutrienti, come zuccheri ed aminoacidi, inizia con la competizione per gli essudati radicali e dei semi in germinazione (De Brito *et al.*, 1995; Hoitink & Boehm, 1999).

Molti patogeni vegetali sono deboli saprofiti (organismi che si sviluppano nutrendosi di materiale organico morto o in decomposizione) e, quindi, scarsi competitori per i nutrienti nei sistemi organici. Questa lotta per

le sostanze energetiche termina con la repressione della germinazione e sviluppo miceliare del patogeno (microbiostasi) (Lockwood, 1990).

Comunque, in contrasto con le potenzialità degli ammendamenti organici, diverse incertezze circa la loro efficacia ne limitano, di fatto, le applicazioni pratiche. Per esempio, alcuni studi indicano che l'efficacia degli ammendamenti con sostanza organica è variabile ed, in alcuni casi, può addirittura determinare un aumento della severità della malattia (Mazzola *et al.*, 2001; Tilston *et al.*, 2002; Pérez-Piqueres *et al.*, 2006). Dopo aver esaminato un gran numero di studi sull'effetto dell'ammendamento organico nella riduzione dell'incidenza delle malattie (250 articoli e 1964 casi), Bonanomi *et al.* (2007) ha riportato che nel 45% dei casi veniva registrata soppressività, nel 35% non si avevano effetti significativi, mentre nel restante 20% si è avuto un effetto condutivo. La capacità soppressiva varia notevolmente tra i diversi tipi di sostanza organica.

L'aumento dell'incidenza delle malattie in seguito alle applicazioni di sostanza organica è stato spesso associato sia all'incremento dell'inoculo del fungo fitopatogeno, poiché la sostanza organica potrebbe fornire il substrato per la sua crescita saprofitaria (Croteau & Zibilske, 1998; Manici *et al.*, 2004; Bonanomi *et al.*, 2006a), sia al rilascio di composti fitotossici (Cochrane, 1948; Patrick, 1971; Bonanomi *et al.*, 2006b), che possono

causare danni alle radici delle piante e predisporle all'attacco del patogeno (Patrick & Toussoun, 1965; Ye *et al.*, 2004).

I risultati non consistenti della lotta alle malattie con gli ammendanti organici ha prodotto scetticismo negli agricoltori in merito all'uso di questi materiali. Inoltre, nonostante l'ampio numero di studi, non ci sono metodi capaci di predire l'effetto della sostanza organica sui patogeni nel suolo (Erhart *et al.*, 1999; Scheuerell *et al.*, 2005; Termorshuizen *et al.*, 2007). Attualmente, un gran numero di studi sono incentrati su diversi aspetti degli ammendanti organici: la capacità di tipi di sostanza organica di contenere diversi patogeni vegetali (Abawi & Widmer 2000; Akhtar & Malik, 2000; Litterick *et al.*, 2004; Noble & Coventry, 2005), e sostenere l'attività dei microbi benefici (Hoithink & Boehm, 1999); l'applicazione del compost tea e degli estratti acquosi dei compost (Scheuerell & Mahaffee, 2002); l'eradicazione di patogeni durante il processo di compostaggio (Noble & Roberts, 2004); le proprietà dei suoli soppressivi (Janvier *et al.*, 2007).

1.3 Utilizzo di torba e compost a scopi fitoiatrici nel settore vivaistico

Tra le principali problematiche del comparto vivaistico vi sono quelle legate al controllo dei patogeni tellurici. Come conseguenza risulta necessario l'impiego massiccio di fungicidi.

La torba è la sostanza organica più comune che entra a far parte della composizione delle mix per la coltivazione di specie ortive ed ornamentali soprattutto in vivaio.

In diversi Paesi europei la politica adottata per il settore è quella di ridurre l'uso di torba nei substrati per la moltiplicazione di specie vegetali al fine di preservare le torbiere considerate alla stregua di aree naturali da tutelare. Dal punto di vista patologico, inoltre, la torba, tra i diversi tipi di ammendamenti organici disponibili, è quella che fa registrare il minor numero di casi di soppressività (Bonanomi *et al.*, 2007). Tale limitata soppressività della torba è imputabile alla ridotta quantità di composti carboniosi che sostengono l'attività dei microbi antagonisti (Boehm *et al.*, 1997). L'opportunità di indurre condizioni di soppressività nelle torbe, riducendone le dosi di impiego e mantenendone le caratteristiche positive, ha stimolato una notevole ricerca negli ultimi anni (Bonanomi *et al.*, 2007).

Le principali strategie suggerite per risolvere il problema prendono in considerazione queste alternative:

- l'addizione di aliquote, anche molto ridotte (fino all'1% in volume), di compost soppressivi alla torba (van Os & van Ginkel, van der Gaag *et al.*, 2007);
- l'aggiunta di organismi antagonisti alla torba (Krause *et al.*, 2001);
- l'utilizzo combinato di organismi antagonisti e compost ad azione sinergica (Whipps, 1997; Hoitink & Boehm, 1999).

Anche la micro- e la mesofauna presente all'interno dei compost contribuisce alla soppressione delle malattie (Friberg *et al.*, 2005). È stato riportato che gli ammendanti organici stimolano lo sviluppo di popolazioni di micro-artropodi che si nutrono di propaguli fungini di *R. solani* (Hoitink & Boehm, 1999) e *Monilinia fructicola* (Brown, 2004).

I compost sembrano funzionare bene come materiali da integrare alle torbe (van der Gaag *et al.*, 2007). I livelli di soppressività dei compost possono essere influenzati dal loro grado di decomposizione (Boehm *et al.*, 1993). Compost “immaturi” o che non sono stati preparati secondo buone prassi possono risultare tossici per le piante ed avere effetti negativi sul loro sviluppo (Hoitink & Fahy, 1986; Arnold Bik & Boertje, 1975; Kipp *et al.*,

2000; Zucconi *et al.*, 1981; Widmer *et al.*, 1998). La fitotossicità si manifesta anche a dosi di impiego elevate (Erhart *et al.*, 1999; Szczech & Smolinska, 2000). L'ammendamento con compost può essere vantaggioso, determinando un incremento le proprietà soppressive, nei confronti di malattie telluriche, del substrato al quale esso è addizionato. Tale aumento di soppressività è dovuto ad un incremento generale dell'attività microbica antagonista nel compost (Hoitink & Fahy, 1986; Hoitink & Boehm, 1999). Comunque tale soppressività può essere altamente variabile e difficile da predire.

L'applicazione di tali strategie ha fatto registrare numerosi successi nel mondo produttivo, oltre che in quello scientifico (Scheuerell *et al.*, 2005; Tuitert *et al.*, 1998). In particolare, l'utilizzo di compost ed altri materiali organici si è dimostrato efficace nella lotta ai patogeni tellurici in numerosi patosistemi tra cui, per menzionarne solo alcuni: *F. oxysporum* f. sp. *basilici* – *Ocium basilicum* (Ferrara *et al.*, 1996; Reuveni *et al.*, 2002), *F. oxysporum* f.sp. *melonis* – *Cucumis melo* (Ros *et al.*, 2005), *P. ultimum* – *Cucumis sativus* (Chen *et al.*, 1988a), *R. solani* – *Brassica oleracea* (Termorshuizen *et al.*, 2007), *Sclerotinia minor* – *Lactuca sativa* (Lumsden *et al.*, 1986).

Il damping-off causato, in particolare da *Pythium* spp., *R. solani* e *Sclerotinia* spp. rappresenta una importante minaccia per il vivaismo e per

l'agricoltura in generale. L'uso di compost per sopprimere queste malattie è stato ampiamente studiato. Nel lavoro di Bonanomi *et al.*, 2007 è stato riportato che *R. solani*, con un gran numero di casi pubblicati (670), è risultato il patogeno più studiato seguito da *Pythium* spp. (473) e *Sclerotinia* spp. (81). L'ordine dei tre patogeni è esattamente l'inverso se si prende in considerazione l'incidenza percentuale dei casi in cui è stata registrata soppressività sul totale.

Questa malattia può essere soppressa incorporando compost nei substrati di coltivazione (Diab *et al.*, 2003; 21 Hoitink *et al.*, 1993; Hoitink & Fahy, 1986; Kuter *et al.*, 1988). La soppressività generale è stata riportata come causa del controllo delle malattie da *Pythium* spp. con ammendanti organici (Hoitink & Grebus, 1994; Boehm *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1987; Craft & Nelson, 1996; Erhart *et al.*, 1999; Inbar *et al.*, 1991a; Lewis *et al.*, 1992; Lumsden *et al.*, 1983b; Kuter *et al.*, 1988; Kwok *et al.*, 1987a; Ringer *et al.*, 1997; Schueler *et al.*, 1989a; Stone *et al.*, 2001).

Un ruolo importante sembrano avere i livelli di biomassa ed attività microbica nei substrati ammendati con compost (Chen *et al.*, 1988b; Chen *et al.*, 1987; Craft & Nelson, 1996; Grebus *et al.*, 1994; Hadar & Mandelbaum, 1986; Kuter *et al.*, 1988; Mandelbaum *et al.*, 1988; Schüler *et al.*, 1989; Theodore & Toribio, 1995) e la respirazione basale dei substrati

(Termorshuizen *et al.*, 2007). L'elevata attività microbica è stata collegata direttamente alla soppressione di *Pythium* (Chen *et al.*, 1988b; Chen *et al.*, 1988a; Craft & Nelson, 1996; Mandelbaum & Hadar, 1990; Ringer *et al.*, 1997). In uno studio di valutazione della soppressività di compost miscelati a torbe, il 67 ed il 64% dei campioni sopprime in modo significativo, rispettivamente, *P. irregolare* e *P. ultimum* su zucca (Sheuerell *et al.*, 2005).

È possibile che elevati livelli di attività microbica rappresentino il risultato di un'aumentata competizione tra le popolazioni di microrganismi contenute negli ammendanti organici ed il patogeno per gli essudati radicali, componenti essenziali per la germinazione dei propagoli del fungo ed il relativo sviluppo miceliare (Craft & Nelson, 1996; Chen *et al.*, 1988a; Hadar & Manelbaum, 1992; Nelson, 1990; van Dijn, 1994) e per i carboidrati (Boehm *et al.*, 1997). La spettroscopia ^{13}C CPMAS NMR (^{13}C cross-polarization magic angle spinning nuclear magnetic resonance), usata per analizzare la distribuzione del carbonio organico in torbe saggiate contro *Pythium* spp., ha permesso di correlare la dinamica della soppressività con il contenuto in carboidrati (Boehm *et al.*, 1997) e, più in generale, con il contenuto di substrati “energetici” (lignina e cellulosa) prontamente disponibili per i microrganismi (Stone *et al.*, 2001).

Compost “immaturi” che sostengono l’attività microbica generale, possono essere molto soppressivi, specialmente contro malattie causate da *Pythium* spp., dal momento che questi patogeni possiedono una bassa capacità competitiva (van der Gaag *et al.*, 2007).

R. solani è un patogeno fungino che causa malattie telluriche su una vasta gamma di piante ospiti . I compost sono stati usati con successo per reprimere le malattie da *Rhizoctonia* spp. (Chung *et al.*, 1988a; Chung *et al.*, 1988b; Diab *et al.*, 2003; Gorodecki & Hadar, 1990; Krause *et al.*, 2001; Kuter *et al.*, 1983; Lumsden *et al.*, 1983b; Nelson & Hoitink, 1982; Nelson & Hoitink, 1983a; Nelson *et al.*, 1983b; Tuitert *et al.*, 1998).

La soppressione del damping-off causato da *R. solani*, invece, è stata frequentemente correlata alla presenza di specifici microbi antagonisti (Krause *et al.*, 2001; Kuter *et al.*, 1983; Kwok *et al.*, 1987b; Nelson *et al.*, 1983a).

È stato riportato che gli effetti soppressivi di un pine bark compost verso *R. solani* erano associati all’incremento delle popolazioni antagonistiche di *Trichoderma* e *Penicillium* spp. (Huang & Kuhlman, 1991) (Kuter *et al.*, 1983; Nelson *et al.*, 1983b). Comunque, Diab *et al.* (2003) recentemente hanno riportato che la soppressione della malattia causata da *R.*

solani in parte è correlata all'incremento generale dell'attività microbica di substrati ammendati con deiezioni suine compostate. Ma, anche in questo caso, gli Autori associano la soppressività con l'incremento di biodiversità microbica e con l'aumento delle popolazioni di specifici gruppi come le *Pseudomonadi* fluorescenti.

In generale, la soppressione di *R. solani* mediante l'ammendamento organico è un fenomeno piuttosto raro. Per esempio, in uno studio che ha coinvolto 36 compost, solo il 17% di essi sopprime *R. solani* su cavolo (Scheuerell *et al.*, 2005). I livelli di soppressività, a parità di compost, variano anche con il patosistema considerato. Per esempio, 18 compost saggiati contro l'insorgenza del damping-off da *R. solani* su cavolo e pino, hanno mostrato livelli di soppressività del 50 e 16%, rispettivamente (Termorshuizen *et al.*, 2007). *R. solani* possiede una capacità competitiva a livello saprofitario più spiccata. È stato riportato che tale fungo utilizza meglio di *Pythium* spp. il substrato ai fini nutrizionali. Incrementi nello sviluppo delle malattie (conducività) causate da *R. solani* potrebbero essere associati alla natura ed alla quantità dei substrati indecomposti presenti ancora nei compost e a una struttura fisica degli stessi meglio colonizzabile da parte delle ife (Harris *et al.*, 2003; Otten *et al.*, 1999). Materiali organici decomposti in maniera ancora insufficiente possono contribuire a un elevato

sviluppo della microflora antagonista; ma, in questo caso, prevale anche l'attività saprofitica di *R. solani* e la soppressività non viene indotta (Nelson *et al.*, 1983b). La sostanza organica degli ammendanti deve essere totalmente colonizzata dai microrganismi competitivi per provocare microbiostasi generale, al punto che *R. solani* sia impossibilitata ad utilizzare direttamente queste fonti nutrizionali (Davey & Papavizas, 1963; Lumsden *et al.*, 1983b; Nelson & Hoitink, 1982).

È stato riportato che alte concentrazioni di glucosio presente in alcune fonti di sostanza organica all'inizio del processo di compostaggio, non solo stimolano la crescita di *R. solani* (Chung *et al.* 1988a; Davey & Papavizas, 1963; Lumsden *et al.*, 1983b; Nelson & Hoitink, 1982; Nelson & Hoitink, 1983a), ma reprimono la parassitizzazione del patogeno da parte di *Trichoderma* spp. (Chung *et al.* 1988a). La riduzione di nutrienti energetici disponibili contenuta negli ammendanti, durante il processo di compostaggio, determinano un cambiamento di tendenza con una maggiore induzione delle interazioni antagonistiche (Chung *et al.* 1988a).

Sclerotinia spp. è un patogeno fungino distruttivo che causa marciumi su diverse specie vegetali. È stata riportata la soppressione del damping-off mediante applicazioni di ammendamenti organici anche in casi di infezioni di *Sclerotinia* spp. (Asirifi *et al.*, 1994; Viana *et al.*, 2000). Rosseau *et al.*,

(2006) riportano, invece, un effetto teso all'aumento della conducibilità del substrato di coltivazione ammendato con compost, in un biosaggio con il patosistema *Sclerotinia* spp./soia. La capacità soppressiva degli ammendamenti organici nei riguardi del damping-off causato da *Sclerotinia* spp. è stata rilevata in oltre il 50% dei casi esaminati da Bonanomi *et al.* (2007), mentre nel 20% si ha conducibilità. È stato riportato che infezioni di *S. minor* su lattuga sono state ridotte del 40-50% addizionando compost al substrato (Lumdsen *et al.*, 1982; 1983a,b). Anche per questo patogeno si ritiene che il controllo della malattia sia determinato dalla soppressività specifica. La riduzione della malattia da parte di compost è stata associata alla presenza di elevate popolazioni di *T. harzianum* e *Streptomyces* spp. (Lumdsen *et al.*, 1986). Ad ogni modo, per questo patogeno sono stati realizzati relativamente pochi studi, rispetto ai patogeni precedenti.

1.4 Dinamiche del processo di compostaggio e di colonizzazione delle comunità microbiche

Il compostaggio è un processo di biostabilizzazione aerobica (ossigeno-dipendente) di matrici fermentescibili. È un processo controllato di degradazione della sostanza organica attraverso il quale è possibile ottenere un prodotto finito stabile dal punto di vista fisico, chimico e microbiologico, di colore brunoastro e con le caratteristiche di un ammendante: il compost (Vallini, 1995).

In condizioni aerobiche ottimali (Tilston, 2002), il compostaggio si svolge attraverso tre stadi principali:

- *Fase mesofila o di latenza* (0-7 giorni): la matrice iniziale viene invasa dai microrganismi, il cui metabolismo causa il progressivo riscaldamento del substrato (50 °C). In questa fase, la decomposizione del substrato è dovuta all'intervento di specie microbiche mesofile che utilizzano rapidamente i composti solubili (zuccheri) e facilmente degradabili (Chen & Inbar, 1993; Hoitink *et al.*, 1996a; Tilston *et al.*, 2002).

- *Fase termofila o di stabilizzazione* (7-27 giorni): in questa fase la temperatura raggiunge valori molto elevati, anche superiori ai 70 °C (Tilston *et al.*, 2002), e si ha l'igienizzazione del substrato: le specie patogene per

l'uomo e per le piante e i semi delle infestanti vengono disattivate e le sostanze prontamente degradabili, come zuccheri, acidi grassi e proteine vengono rapidamente consumate (De Bertoldi *et al.*, 1983; Chen & Inbar, 1993; Hoitink & Boehm, 1999; Hoitink & Grebus, 1994; Hoitink *et al.*, 1996a).

- *Fase di maturazione* (27-365 giorni): con il ridursi della disponibilità di composti ricchi di energia, la temperatura della matrice in trasformazione diminuisce (circa 50 °C), consentendo alle popolazioni microbiche mesofile, responsabili dei processi di umificazione, di colonizzare il substrato (De Bertoldi *et al.*, 1985; Tilston *et al.*, 2002). Le sostanze più resistenti quali lignine, cellulose ed emicellulose sono soggette a degradazione da parte dei microrganismi termofili che invadono nuovamente il materiale in compostaggio, ed infine, anche la microflora mesofila, così come la microfauna colonizzano il compost (Chen & Inbar, 1993). Dopo questa fase si ottiene un prodotto costituito da sostanza organica stabilizzata, formata da composti ad alto peso molecolare (Senesi, 1989).

In questa terza fase del processo di compostaggio, prende forma una competizione intensa tra i microrganismi, per i nutritivi che sono rimasti, e si sviluppa anche un antagonismo attraverso la produzione di antibiotici (Chen & Inbar, 1993).

La richiesta di ossigeno è molto elevata nella fase termofila per poi decrescere lentamente durante l'avanzamento del processo: esiste infatti una relazione tra consumo di ossigeno e attività microbica, consumo che risulta massimo a temperature tra i 30-55 °C. La scarsa ossigenazione della massa può portare allo sviluppo di una microflora artefice di fermentazioni indesiderate, di accumulo di composti ridotti (acidi grassi volatili, idrogeno solforato, mercaptani) e rilascio di odori sgradevoli (Vallini, 1995). Per assicurare una buona ossigenazione la biomassa deve essere aerata tramite rivoltamento o insufflazione di aria. Fondamentali nel metabolismo microbico sono il carbonio e l'azoto, il primo usato come fonte energetica, il secondo per la sintesi del protoplasma. Con un rapporto tra questi elementi troppo alto ($C/N > 35$) il boom microbico non ci sarà fino a che il rapporto non si sarà abbassato con l'ossidazione del carbonio in eccesso.

Con un rapporto C/N troppo basso, invece, sono favorite perdite di azoto sotto forma ammoniacale. Il rapporto ottimale è di 20-25 parti di carbonio su una di azoto (Vallini, 1995). Durante il processo si verifica una perdita di azoto, imputabile alla volatilizzazione sia di ammoniaca che di azoto elementare. La perdita di azoto, dovuta ai processi anaerobici di denitrificazione, può essere limitata attraverso l'aerazione della massa. Nelle

ultime fasi del processo si ha comunque un parziale recupero dell'azoto perduto grazie all'attività dei batteri azoto-fissatori liberi (Nuntagij, 1990).

Un giusto equilibrio tra la fase acquosa e la fase gassosa della biomassa consente, nel primo caso, di veicolare il trasporto degli elementi nutritivi e il movimento dei microrganismi e, nel secondo caso, di garantire una sufficiente ossigenazione. Un valore ottimale di umidità dovrebbe essere intorno al 45-65% e mai al di sotto del 40% .

Il valore del pH varia notevolmente durante il processo a seconda della fase in cui ci troviamo: durante la prima fase, in cui si ha il rilascio di acidi organici, il pH tende a scendere, per poi subito risalire durante la fase termofila in cui la proteolisi e il rilascio di ammoniaca ne provocano un innalzamento. Nelle fasi finali tende di nuovo ad abbassarsi ritornando a valori intorno alla neutralità (Vallini & Orselli, 1987).

Come accennato in precedenza, la fase termofila del processo di compostaggio è molto importante dal punto di vista sanitario e fitosanitario: le elevate temperature di questa fase garantiscono la disattivazione dei patogeni umani, della maggior parte dei microrganismi fitopatogeni e dei semi delle erbe infestanti. Tuttavia temperature elevate per lunghi periodi di

tempo possono portare ad un rallentamento del processo di compostaggio, problema controllabile comunque attraverso una buona aerazione.

Durante la fase mesofila, invece, la sostanza organica si avvia verso la stabilizzazione, che consiste soprattutto in un arricchimento in composti umici. Tali composti, una volta applicati al terreno, andranno lentamente incontro a processi di mineralizzazione rilasciando nutrienti utili alla crescita delle piante.

Le popolazioni microbiche che partecipano al processo, variano a seconda delle condizioni del microambiente della massa in fermentazione: la fase termofila ospita solo una cerchia ristretta di batteri, in grado di sopravvivere ad alte temperature: i batteri termofili. I funghi invece, responsabili della degradazione di complessi carboniosi come la cellulosa e la lignina, intervengono nella fase mesofila, quando la temperatura scende al di sotto di una certa soglia. La fase finale, in cui si ha l'umificazione della sostanza degradata nelle fasi precedenti, avviene ad opera degli attinomiceti. La colonizzazione del compost da parte di agenti di biocontrollo, o microrganismi benefici, avviene principalmente in questa fase durante la quale la disponibilità di fonti energetiche per la microflora diviene un fattore limitante. Come risultato, si ha un declino contemporaneo della velocità di decomposizione della massa, dell'attività microbica e della temperatura

(Hoitink *et al.*, 1996a). Dopo che la temperatura scende sotto i 40°C, i microrganismi termofili ricolonizzano la massa a partire dagli strati “meno caldi”. I microrganismi benefici, spesso, non sopravvivono alle alte temperature del processo di compostaggio, raggiungendo livelli tali da non poter determinare la soppressività delle malattie delle piante (Hoitink & Grebus, 1994). Tali microrganismi giungono dall'esterno. La letteratura suggerisce che compost prodotti all'aperto vicino alle foreste, oppure in altri ambienti caratterizzati da elevata concentrazione di popolazioni microbiche e da biodiversità, sono più soppressivi nei confronti di malattie telluriche, rispetto a compost prodotti, a partire dagli stessi materiali, in ambienti chiusi, dove dette specie non sono presenti (Kuter *et al.*, 1983).

Le potenzialità nella soppressione dei patogeni e delle malattie sono espresse maggiormente dopo il picco di temperatura, e durante la fase successiva. Le lignine e altri componenti recalcitranti si decompongono più lentamente e quindi sono in grado di supportare più a lungo l'attività di specifici microrganismi benefici (Hoitink & Grebus, 1994).

Bacillus spp., *Enterbacter* spp., *Flavobacterium balustinum*, *Pseudomonas* spp. e altri generi batterici e *Streptomyces* spp., *Pencillium* spp., *Trichoderma* spp., *Gliocladium virens* e altri funghi sono stati individuate nei compost quali agenti di biocontrollo. Comunque, la ricolonizzazione del

compost da parte di microrganismi benefici è casuale, e contribuisce alla variabilità nella soppressione delle malattie.

1.5 Scopo del lavoro di tesi

Gli ammendamenti organici dei suoli e dei substrati di coltivazione, comunemente utilizzati nel settore vivaistico, rappresentano una potenziale alternativa alle tradizionali tecniche di lotta ai patogeni tellurici. La soppressività intrinseca e/o la capacità di questi materiali di trasferirla, o accentuarla in altri substrati, costituisce una loro risorsa poter utilizzare in campo fitopatologico. L'utilizzazione di compost sta assumendo negli ultimi anni un'importanza crescente anche per considerazioni di carattere economico ed ambientale.

I compost possono essere dei validi “integratori” delle torbe, di cui possono sostituire aliquote anche di importante entità, al fine di ridurne le quantità utilizzate e migliorarne le performance fitoiatriche.

Tali positività possono rendere questi materiali più appetibili nel mercato di riferimento e costituire una via di smaltimento eco-compatibile di rifiuti di vario genere (rsu, deiezioni zootecniche, residui colturali e/o industriali, materiali di potatura, etc.). In questo lavoro viene studiato l'effetto di 5 compost e 2 torbe sulla crescita delle piante, sullo sviluppo saprofitario di patogeni fungini e nell'interazione pianta-patogeno.

L'obiettivo generale è quello di valutare la capacità di tali materiali di sopprimere il damping-off causato da *P. ultimum*, *R. solani* e *S. minor* sulla pianta ospite *L. sativum*. I saggi sono stati condotti su 3 patosistemi, al fine di avere anche informazioni sulla multisoppressività. La capacità di ridurre l'incidenza del damping-off da parte di questi ammendanti organici, è stata messa in relazione con le loro caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche. In molti studi sull'uso di compost e di altri ammendanti organici come mezzo di lotta alle malattie telluriche, infatti, sono stati misurati diversi parametri al fine di caratterizzare i materiali risultanti soppressivi (Hoitink & Boehm, 1999; Abawi & Widmer 2000; Litterick *et al.* 2004; Noble & Coventry, 2005; Bonanomi *et al.*, 2007). Tale studio è stato portato avanti, tra l'altro, mediante una caratterizzazione NMR e la misura dell'attività enzimatica e metabolica delle comunità microbiche residenti.

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è stata usata in studi precedenti al fine di ottenere informazioni circa la distribuzione del carbonio organico tra le diverse classi di molecole (Chen, 2003). La tecnica NMR è stata applicata, inoltre, per meglio comprendere come la trasformazione della sostanza organica durante il processo di decomposizione influenza la crescita delle piante, anche in presenza del

patogeno (Boehm *et al.*, 1997; Chen & Inbar, 1993; Inbar *et al.*, 1989; Inbar *et al.*, 1993; Stone *et al.*, 2001). Questo approccio veniva seguito per determinare la capacità potenziale della sostanza organica di supportare l'attività microbica e determinare, quindi, la soppressività generale delle malattie telluriche (Chen & Inbar, 1993; Inbar *et al.*, 1989).

La caratterizzazione microbiologica è stata condotta mediante la determinazione dei livelli di idrolisi della fluoresceina diacetato, che è una misura dell'attività enzimatica totale, e dei livelli di attività generali di β -N-acetilglucosamminidasi, chitobiosidasi e glucanasi. Queste ultime sono state prese in considerazione dal momento che nel processo di parassitizzazione operato da microbi antagonisti sono coinvolte chitinasi (β -N-acetilglucosamminidasi, chitobiosidasi) e glucanasi. Tali enzimi degradativi della parete cellulare dei funghi, detti anche CWDEs (Cell Wall Degrading Enzymes) sono in grado di attaccare il fungo ospite prima dell'effettivo contatto fisico (Zeilinger *et al.*, 1999; Viterbo *et al.*, 2002; Lorito, 1998). Lo studio dell'attività microbica da sola non permette però di evidenziare la struttura delle comunità. Pertanto, al fine di ampliare le informazioni sulle caratteristiche microbiologiche del compost, in questo lavoro è stata presa in considerazione anche l'analisi dell'impronta metabolica (fingerprint) di comunità mediante la tecnica BiologTM.

2. MATERIALI E METODI

2. MATERIALI E METODI

2.1 Collezione di campioni di Torbe e Compost ed analisi chimiche

L'elenco e la descrizione dei materiali organici utilizzati nel presente studio, sono riportati in **tabella 1**.

	Descrizione	Materiale di partenza	Durata processo (gg)
a	Ammendante compostato misto da residui della lavorazione enologica	Vinacce + potature tritate	60
b	Compost di frazione organica da raccolta differenziata presso le famiglie	"Umido" + potature tritate	60
c	Compost di forsu selezionata meccanicamente	frazione organica dei rifiuti solidi urbani	90
d	Compost di deiezioni zootecniche	deiezioni avicole e suine sottoposte a digestione anaerobica seguita dal compostaggio	60
e	Ammendante Torboso Compostato Misto	torba 50%, Compost da "Umido" + potature tritate 40%, limo + argilla + pomice 10%	60
f	Torba "chiara"	Torba Bionda 70% e Torba Bruna 30% di sfango, 0,5 Kg/m ³ PG-Mix 14-16-18, 0,9 l/m ³ Tensid, 50 g/m ³ Microelementi.	-
g	Torba "scura"	Torba Bionda 50% e Torba Bruna 50% di sfango, 0,5 Kg/m ³ PG-Mix 14-16-18.	-

Tabella 1. Elenco dei materiali organici (ammendanti) saggiati nel presente studio, con la descrizione, l'indicazione del materiale di partenza e della durata (in giorni) del processo di compostaggio. Ciascun materiale è contrassegnato da una lettera, in ordine alfabetico, riportata in seguito in tutti gli esperimenti.

Tali materiali sono stati sottoposti ad analisi chimiche per le determinazioni delle forme di azoto (N totale, ammoniacale e organico, metalli pesanti) mediante l'applicazione di protocolli prescritti dal Regolamento CE n.2003 del 13/10/2003, e delle forme di carbonio (C organico totale ed estraibile), mediante l'applicazione di protocolli pubblicati su G.U. n.21 del 26/01/2001. Inoltre sono stati determinati: il tasso di umidità relativa, mediante essiccazione in stufa a 60°C per 24 h di un campione di 1 gr, ed il pH e l'EC in accordo a quanto descritto da Bonanomi *et al.*, (2008).

2.2 Biosaggi per la valutazione del damping-off

I Biosaggi *in vivo* per la determinazione dell'incidenza del damping-off sono stati condotti in vaso, con le torbe e le mix di torba + compost usate quale substrato di coltivazione. Le mix consistevano in torba scura (g) sottoposta a sterilizzazione, ammendata con compost. Sono state usate due tipi di mix con dosi di ammendamento pari a 10 e 20% (vol./vol.). Sia le torbe che le mix sono state saggiate in forma non-sterile (ns), e dopo essere state sottoposte a processo di sterilizzazione in autoclave per 2 volte, a distanza di 1 ora, a 122 °C per 22'. Ventiquattro diversi substrati di coltivazione così ottenuti sono stati saggiati per verificare le capacità di

contenere lo sviluppo di malattie telluriche causate da 3 patogeni fungini (*P. ultimum*, *R. solani* e *S. minor*). Sono stati utilizzati ceppi dei tre funghi citati originariamente isolati da ospiti di interesse agrario in seguito ad infezioni naturali (Campania, Italia) e poi re-isolati da *Lepidium sativum* in seguito ad infezioni artificiali. Tali isolati fungini (ITA-LS) sono stati posti in coltura pura su PDA e conservati presso la micoteca del Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale presso l'Università di Napoli "Federico II". Le torbe e le mix di Torba+Compost sono state saggiate contro l'insorgenza del damping-off causato da *P. ultimum*, *R. solani* e *S. minor* sull'ospite vegetale *L. sativum*. I patogeni sono stati inoculati mediante granelli di miglio infetti preparati come segue. Una beuta contenente 500 ml di PDB (Potato dextrose broth; DIFCO) 0.1x e granelli di miglio 1:1 (p/p), è stata autoclavata a 122°C per 22' e, dopo raffreddamento, inoculata con una colonia fungina (tagliata con bisturi in 8/10 parti uguali), cresciuta per 1 settimana a 24°C su PDA (Potato dextrose agar; DIFCO) (15 ml) in piastra Petri. Le beute di miglio inoculate sono state poste in incubazione per un'ulteriore settimana, a 24 °C e periodicamente (ogni 48 h), agitate a mano ed ossigenate mediante rimozione del tappo. Il miglio infetto è stato quindi lasciato asciugare sotto cappa a flusso laminare per 48 h prima di essere utilizzato negli esperimenti. I substrati di coltivazione nelle prove

contro ciascun patogeno, sono stati combinati con 4 livelli d'inoculo (nessun inoculo, bassa, media ed alta dose) di miglio infetto con micelio fungino. L'inoculo a dose bassa, media ed alta è stato ottenuto mescolando lo 0.3, 1 e 3 % (p/Vol.) di miglio infetto con il materiale organico. Tutti gli esperimenti sono stati replicati 5 volte. I vasi allestiti, in cui sono stati posti a dimora 20 semi di *L. sativum* per ognuno, sono stati irrigati con H₂O sterile e posti in serra a 25 °C di media. Dopo 1 settimana dalla semina è stata determinata l'incidenza del damping-off. Per comparare i livelli della malattia tra i diversi materiali organici, l'intensità della malattia nei vasi inoculati è stata confrontata con il relativo controllo non inoculato. L'incidenza percentuale del damping-off (%DO) è stata calcolata con la formula:

$$\%DO = \frac{PSo - PSi}{PSo} \times 100 \quad (\%)$$

dove:

PSo= piante sane nel controllo non inoculato;

PSi= piante sane nel vaso inoculato.

2.3 Valutazione della fitotossicità e della crescita fungina sugli estratti acquosi dei materiali

La valutazione della fitotossicità e della capacità di influenzare lo sviluppo saprofitario di funghi fitopatogeni, degli estratti acquosi dei compost e delle torbe, è stata eseguita come descritto da Bonanomi *et al.* (2006), con qualche modifica. Gli estratti sterili sono stati diluiti con acqua (10%, 3% and 1%) ed usati per i saggi. Gli esperimenti sono stati eseguiti in una camera di crescita a temperatura costante (25 °C), al buio. Venti semi di *L. sativum* sono stati posti in piastre Petri sopra uno strato di carta da filtro sterile, insieme a 4 ml di estratto. Ciascuna diluizione (quattro, inclusa l'acqua sterile come controllo) è stata replicata 5 volte. Le piastre Petri sono state disposte secondo uno schema casuale nella camera di crescita e la lunghezza delle radici dei germinelli è stata misurata dopo 36 h. I dati sono stati espressi in percentuale del controllo in acqua sterile.

Inoltre, è stato saggiato l'effetto degli estratti acquosi dei materiali in studio sullo sviluppo saprofitario dei ceppi ITA-LS di *P. ultimum*, *R. solani* e *S. minor*, usati nelle prove *in vivo*. Il substrato agarizzato è stato preparato con Agar (15 g/l), H₂O sterile + estratto, al fine di ottenere una diluizione di quest'ultimo del 10%. Sono stati preparati due serie di piastre con estratto tale quale e con lo stesso previa filtrosterilizzazione, in maniera tale da poter

valutare in ciascuna prova l'effetto della componente biotica. Dieci ml di substrato sono stati versati in piastre Petri di 9 cm. Dopo la solidificazione un dischetto di micelio per ciascuna specie fungina, raccolto da una colonia in attiva crescita su PDA, è stato posizionato al centro della piastra Petri. La crescita miceliare radiale della colonia è stata misurata (in mm) ogni 24 h per 3 giorni. Nell'ultimo giorno è stata misurata la densità ifale di ciascuna colonia, in cinque punti, scelti a caso, del suo fronte di avanzamento, contando il numero di ife comprese in un settore della larghezza di un mm. In questo esperimento sono state realizzate 5 repliche per ogni trattamento.

2.4 Spettroscopia ^{13}C CPMAS e ^{31}P DPMAS NMR

Gli spettri NMR delle sostanze organiche in studio sono stati acquisiti con la tecnica ^{13}C CPMAS (Cross Polarisation Magic Angle Spinning ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) e ^{31}P -DPMAS (Direct Polarization Magic Angle Spinning ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) con un apparecchio Bruker AV300 operante alla frequenza di risonanza sul ^{13}C a 75.475 e sul ^{31}P a 121.442 MHz. I campioni (100-150 mg) sono stati introdotti in rotori da 4 mm Kel-F caps e fatti girare a 13 ± 1 kHz. Negli esperimenti ^{31}P -DPMAS sono state eseguite 5000 scansioni con

3280 data points in un tempo di acquisizione di 45 ms, e un tempo di riciclo di 10 s. Gli esperimenti ^{13}C -CPMAS sono stati condotti collezionando 6000 scansioni con 2266 data point con un tempo di acquisizione di 25 ms, e un tempo di riciclo of 2.0 s. Gli spettri sono stati analizzati usando il software Bruker Topspin 1.3. Tutti le curve di decadimento esponenziale (FID) sono state trasformate utilizzando prima un 4 k zero filling e poi una funzione esponenziale filtro con Line Broadening (LB) di 100HZ. Le aree dello spettro di risonanza di ^{13}C sono state assegnate in accordo a Knicker & Lüdemann (1995) e Peuravuori & Pihlaja (1998) in sette regioni spettrali come segue: 188-164 ppm (carboxyl/amide), 164-141 ppm (O-aryl), 141-111 ppm (aryl), 111-92 ppm (di-O-alkyl), 92-66 ppm (O-alkyl), 66-46 ppm (methoxyl/N-alkyl), 46-0 ppm (alkyl). L'area di ciascuna regione spettrale (R_i^{abs}) è stata divisa per la soma dell'area di tutto lo spettro, al fine di ottenere una percentuale relativa ($R_i^{\%}$):

$$R_i^{\%} = \left(\frac{R_i^{\text{abs}}}{\sum_i R_i^{\text{abs}}} \right) \times 100.$$

L'indice $R_i^{\%}$ è stato utilizzato come variabile per le analisi statistiche.

2.5 Misura delle attività enzimatiche

L'attività esochitinasica e glucanasica è stata misurata saggiando estratti acquosi extracellulari dei compost e delle torbe ottenuti attraverso la seguente procedura. Cento g (peso secco) di materiale organico sono stati sospesi in 1 l di H₂O sterile in una beuta. Il tutto è stato posto in agitazione (140 rpm) a 25 °C per 2 h. la sospensione è stata centrifugata a 16000 g per 10' a 20 °C (Centrifuga Sorvall SC5C plus, Usa). Il surnatante è stato recuperato e ridotto a 1/20 del volume iniziale mediante rotovapor (Büchi Heating Bath B-490, Svizzera) a 40 °C e pompa a membrana (Vacuubrand GMB H + CO, Germania). La sospensione è stata filtrata attraverso un filtro da 0.22- μ m (Millipore, Bradford, MA), e conservata a -20 °C con 20% di glicerolo fino all'uso. I livelli di proteine totali sono stati determinati in accordo a quanto descritto da Napolitano *et al.*, (2006).

Per determinare l'attività esochitinasica, sono stati effettuati saggi in grado di misurare l'attività N-acetilglucosaminidasica (NAGasi), quella chitobiosidasica (Biasi) e quella glucanasica, usando come substrati di reazione, rispettivamente, il p-nitrofenil- β -D-N-acetilglucosaminide, il p-nitrofenil- β -D-N-N'diacetilchitobioso e il p-nitrofenil- β -D- glucopiranoside (Sigma). Tali substrati sono stati sciolti in tampone potassio fosfato (50 mM, pH 6.7) alla concentrazione di 0.3mg/ml . All'interno dei pozzetti di

piastre ELISA sono stati aggiunti nell'ordine 30 µl di substrato, 10 µl del filtrato colturale da saggiare, e 50 µl di tampone. I controlli sono stati effettuati ponendo al posto del filtrato colturale il solo tampone. La piastra è stata incubata a 50° C per 30 minuti sia nel caso della NAGasi che della Biasi, e a 37 °C per 30 minuti per la glucanasi. Per arrestare la reazione enzimatica sono stati aggiunti poi 30 µl di Na₂CO₃ (0.4 M). Attraverso la misura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 405 nm (spettrofotometro Bio Rad) è stata valutata la quantità di p-nitrofenolo rilasciato da ciascuna attività enzimatica: 0.1 unità di assorbanza sono corrispondenti a 1 unità di attività enzimatica (Napolitano *et al.*, 2006).

L'attività idrolasica è stata determinata utilizzando come substrato il diacetato di fluorescina: il prodotto della sua idrolisi enzimatica, la fluorescina, presenta un picco di assorbimento a 490 nm. Un g (peso secco) di materiale organico "umido", posto in tubi da 15 ml (Falcon), è stato sospeso in 6 ml di tampone fosfato a pH 7,6 e 100 µl di soluzione di diacetato di fluorescina (FDA), alla concentrazione di 2 mg/ml. I campioni sono stati incubati per 1 h alla temperatura di 25 °C, al buio e sotto agitazione. Al termine dell'incubazione la reazione è stata bloccata aggiungendo 6 ml di acetone. Le miscele di reazione sono state centrifugate e filtrate prima di determinare l'assorbanza della fluorescina a 490 nm. La

quantità di FDA idrolizzato è stata determinata per interpolazione dei valori di assorbanza su una retta di taratura e l'attività enzimatica è stata espressa come µg di FDA idrolizzato per grammo di terreno in 1 h di incubazione.

2.6 Misura delle popolazioni microbiche

Le popolazioni microbiche sono state determinate per diluizioni seriali di sospensioni acquose de materiale organico saggiato su substrati agarizzati. Dieci g di materiale sono stati sospesi in 90 ml di H₂O sterile e sottoposti a forte agitazione (vortex) per 5'. Le 5 diluizioni seriali di tale sospensione sono state inoculate (100 µl) in 3 piastre per ciascuna, contenenti: 10% TSA (Tryptic Soy Agar, Difco) per le conte dei batteri totali; PDA (Potato dextrose agar) con 50 mg di clortetraciclina e 1 ml/l di tergitol, per le conte dei funghi totali. Le piastre per le conte batteriche sono state incubate a 28° per 3 giorni, mentre quelle per i funghi sono state poste a 25 °C per una settimana.

2.7 Analisi Biolog per la determinazione dei profili metabolici delle comunità microbiche

L'analisi dell'attività metabolica dei microrganismi contenuti nei materiali è stata eseguita con il sistema Biolog EcoPlate™.

Le cellule formanti le comunità microbiche, residenti nei materiali saggiati, sono state estratte attraverso le seguenti procedure. Un g (peso secco) di materiale, pestato con l'ausilio di un mortaio sotto cappa a flusso laminare, è stato trasferito in un tubo sterile da 50 ml dotato di tappo a vite (Falcon) al quale sono stati aggiunti 20 ml di H₂O. I tubi contenenti la sospensione sono stati posti in agitazione (50 giri/min) per 2 ore a temperatura ambiente su un agitatore orizzontale, quindi centrifugati a 800 g per 2'. Il surnatante è stato recuperato e conservato a 4 °C, mentre il precipitato è stato risospeso con H₂O e sottoposto ad un nuovo ciclo di estrazione. Il secondo surnatante è stato unito al primo, ed il precipitato scartato. La sospensione cellulare ottenuta è stata utilizzata per preparare le diluizioni necessarie per l'inoculazione delle piastre EcoPlate™. Esperimenti preliminari hanno consentito di individuare in una ulteriore diluizione (1:10) della sospensione una condizione ottimale per l'ottenimento di risultati confrontabili tra i vari campioni. La sospensione di ciascun campione, alla diluizione indicata, è stata usata per inoculare una piastra EcoPlate™ con

100 µl per pozzetto. Le piastre sono state poste in incubazione a 28 °C per 4 giorni, e sottoposte ogni 24 h a lettura spettrofotometrica, eseguita con lettore per micropiastre (Biorad) a 592 nm. Le letture sono state effettuate a 0, 24, 48, 72, e 96h. L'analisi dei dati è stata effettuata sulle misure di densità ottica da cui è stata sottratta l'assorbanza al tempo zero, ed il più basso valore di assorbimento registrato nell'intera piastra (Insam *et al.*, 1996). Ciascuna piastra, dopo ogni lettura, è stata riposta singolarmente nell'incubatore in busta sterile di plastica a chiusura ermetica, allo scopo di limitare la disidratazione dei pozzetti.

Una piastra Biolog EcoPlate™ contiene 31 delle fonti di carbonio più utili ai fini dell'analisi della comunità microbica estratta da un substrato di coltivazione (suolo, compost, torba, etc.). Le comunità microbiche danno un pattern caratteristico di utilizzazione chiamato fingerprint metabolico. Tutte le informazioni ottenute dalle letture spettrofotometriche sono state elaborate per determinare i valori di AWCD (Average Well Colour Development), H' (Indice di Shannon-Weaver) e VC (Versatilità Catabolica).

L'AWCD rappresenta il valore medio di colorazione dei pozzetti. Si tratta di una misura dell'attività totale che riassume per ogni piastra e per ciascun tempo di incubazione la risposta metabolica dei microrganismi.

$$AWCD = \sum_{(i=1,31)} (R_i - C) / 31$$

Dove:

C= OD₅₉₀ del controllo

R_i= OD₅₉₀ del i-esimo pozzetto

La Diversità funzionale o indice H', misura la biodiversità in base al numero di differenti substrati che sono utilizzati da una comunità microbica.

$$H' = -\sum_{i=1, n} p_i \ln p_i$$

dove:

p_i = Rapporto fra OD₅₉₀ per ogni pozzetto (corretto del valore di controllo) e somma degli OD₅₉₀ di tutti i pozzetti

n= numero di fonti di carbonio disponibili

L'indice VC è un indice che fornisce una stima delle potenzialità degradative delle comunità microbiche

$$VC = \frac{M}{SD}$$

dove:

M= media di tutti i valori di OD₅₉₀ della piastra considerata

SD= Deviazione standard calcolata su tutti i valori di OD₅₉₀ della piastra considerata

Valori elevati di VC corrispondono ad un'elevata diversità funzionale della comunità e viceversa.

Inoltre, i dati grezzi di assorbanza rilevati ai quattro tempi per ciascuna fonte di carbonio sono stati elaborati per determinare i valori dell'Area Sottesa alla Curva di Assorbanza (ASCA) come suggerito da Guckert *et al.* (1996). Tali valori, sono stati sottoposti, inoltre, all'Analisi in Componenti Principali (PCA), un'analisi fattoriale che permette di descrivere e di ordinare vasti insiemi di dati. La PCA consente di riassumere in poche “nuove” variabili le informazioni contenute in un numero di variabili troppo ampio da poter essere gestito con i metodi statistici più semplici. Vengono utilizzati diagrammi di dispersione per interpretare i risultati.

2.8 Analisi statistiche dei dati

I dati sono stati analizzati statisticamente usando l'analisi della varianza (ANOVA). L'ANOVA ad una via è stata applicata ai saggi di crescita saprofitaria dei funghi ed in quello di fitotossicità. L'ANOVA a due vie è stata applicata ai risultati del biosaggio per la valutazione dell'incidenza del damping-off e nei risultati delle conte microbiche ed attività enzimatiche. Le relazioni tra diversi parametri misurati per ciascun materiale sono state stimate usando l'analisi di regressione. La significatività dei risultati è stata attribuita per valori di $P < 0.05$ in tutti i casi.

3. RISULTATI

3. RISULTATI

I dati relativi alle caratteristiche chimiche dei materiali organici saggiati nel presente studio sono riportati in **tabella 2**.

Parametro	Materiali						
	a	b	c	d	e	f	g
N Totale	2,751	2,253	2,762	3,428	1,547	1,092	1,106
N Ammoniacale	0,179	0,042	0,06	0,623	0,028	0,029	0,031
N Organico	2,448	2,141	2,262	2,767	1,405	1,05	1,064
C Organico Totale	23,6	28,9	33,9	35,6	26,7	44,5	40,9
C Estraibile Totale	15,4	22,4	19,6	18	19,6	10,8	15,1
CH	4,67	6,27	3,48	5,14	3,4	3,15	4,59
HI	2,29	2,58	4,63	2,51	4,78	2,41	2,29
DH%	30,4	28	17,7	28,5	17,3	29,3	30,4
HR%	19,8	21,7	10,3	14,5	12,7	7,08	11,2
Cu	140	76,2	56,93	263	42,5	12,3	14,5
Cd	2,49	3,58	4,6	2,54	2,9	0,5	0,5
C/N	9,641	13,498	14,987	12,866	19,004	42,381	38,440
pH	9,16	9,66	9,05	9,29	7,63	5,70	6,09
EC	0,23	2,73	2,67	4,62	1,74	0,34	0,31
RH	7,0	7,4	17,9	12,4	18,5	19,9	15,5

Tabella 2. Analisi chimiche dei materiali (a, b, c, d, e, f, g). I livelli di azoto (totale, ammoniacale e organico), quelli di carbonio (organico totale, estraibile ed unificato) e l'umidità relativa (RH) sono espressi in g/100g. in tabella sono riportati, inoltre, l'indice (HI), il grado (DH%) ed il tasso (HR%) di umificazione. Il contenuto in Cu e Cd è espresso in ppm. La conducibilità elettrica (EC) è espressa in mS/cm.

3.1 Incidenza del damping-off

I dati relativi all'incidenza del damping-off rilevata nei saggi *in vivo* con i patogeni, sono riportati in **tabella 3** e **figura 1**. La severità della malattia aumenta sempre con la dose di inoculo, anche se non in maniera proporzionale (**figura 4**). La sterilizzazione dei materiali organici, con l'annullamento della componente biotica ivi presente, a parità di altre condizioni, ha determinato un aumento della severità della malattia in tutti i casi (**figure 2 e 3**).

Nelle mix costituite da torba + compost è stata registrata una minore incidenza della malattia rispetto a quanto succede nelle applicazioni di sola torba. L'ammendamento della torba con compost, infatti, ha comportato una riduzione significativa dell'incidenza del damping-off, rispetto a quanto rilevato per la torba non ammendata, pari al 38% nel caso di *P. ultimum*, al 21% nel caso di *R. solani* e al 33% nel caso di *S. minor* (**tabella 3**).

L'ammendamento con compost *d*, che ha comportato i livelli più bassi di malattia nei biosaggi con i tre patogeni utilizzati, mostra buone proprietà soppressive. *P. ultimum* ha causato i più bassi livelli di malattia nelle mix ammendate con i compost *b*, *d* ed *e*, *R. solani* nelle mix con compost *a* e *d*, mentre *S. minor* nelle mix con i compost *b* e *d*.

Incidenza damping-off (%)													
Materiale	Patogeni inoculati												
	<i>P. ultimum</i>						<i>R. solani</i>						<i>S. minor</i>
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1
CAV	L s	67.9±5.5	80.1±9.9	91.6±3.7	10.2±5.3*	26.5±10.6*	10.2±5.3*	26.5±10.6*	34.7±4.9*	75.5±11.5	98.9±1.1	100±0	75.5±11.5
	ns	42.4±4.8	65.3±11.0	71.6±6.5	48.4±14.0	58.9±7.7	48.4±14.0	58.9±7.7	58.9±15.0	47.4±11.8	86.3±9.1	96.8±1.4	47.4±11.8
	H s	77.8±2.5	79.3±12.3	78.6±8.6	10.2±5.3*	26.5±10.6*	10.2±5.3*	26.5±10.6*	34.7±4.9*	88.8±3.8	100±0	100±0	88.8±3.8
	ns	39.5±10.9	65.6±8.9	68.6±8.3	12.2±6.5*	29.6±16.1*	12.2±6.5*	29.6±16.1*	38.8±10.7	67.4±7.6	95.9±3.3	100±0	67.4±7.6
FAM	L s	26.7±6.7*	30.1±4.4*	31.7±3.8*	37.1±16.1	47.2±16.4	37.1±16.1	47.2±16.4	78.6±7.3	32.6±5.2	84.3±14.6	88.7±12.6	32.6±5.2
	ns	27.56±2.1*	32.67±7.1*	28.41±5.1*	32.95±12.3	45.45±10.9	32.95±12.3	45.45±10.9	64.8±16.5	23.8±6.5*	43.9±8.7*	54.9±15.5*	23.8±6.5*
	H s	36.2±6.1*	37.8±8.2*	36.9±5.4*	47.8±14.2	59.6±17.2	47.8±14.2	59.6±17.2	60.6±12.2	12.8±8.1*	64.9±19.4	88.3±8.3	12.8±8.1*
	ns	27.39±4.3*	35.37±6.0*	43.35±8.7*	34.0±11.7	59.57±15.2	34.0±11.7	59.57±15.2	63.8±10.9	3.2±6.1*	34.0±8.1*	64.9±11.7*	3.2±6.1*
MEC	L s	52.1±8.5	58.5±7.7	74.5±7.3	46.8±6.8	48.9±4.8	46.8±6.8	48.9±4.8	76.6±7.7	67.1±11.5	87.2±9.5	95.7±4.7	67.1±11.5
	ns	41.7±9.7	44.1±8.8	60.9±11.4	32.9±10.3	51.1±6.9	32.9±10.3	51.1±6.9	56.4±11.6	35.1±5.4	45.7±12.2*	70.2±16.9	35.1±5.4
	H s	50.3±4.5	57.6±5.9	73.1±8.6	25.0±5.7	34.8±11.6	25.0±5.7	34.8±11.6	52.2±9.5	63.1±18.3	97.8±1.5	96.7±3.6	63.1±18.3
	ns	47.01±2.4	47.83±6.5	66.58±6.2	31.5±12.8	45.65±13.9	31.5±12.8	45.65±13.9	47.8±11.4	28.3±10.2*	34.8±11.4*	71.7±3.9	28.3±10.2*
ZOO	L s	43.4±0.9	50.3±7.6	52.5±4.8*	26.5±7.6	29.6±6.1	26.5±7.6	29.6±6.1	37.7±11.6	41.8±3.8	47.9±11.3*	68.4±12.4	41.8±3.8
	ns	54.5±2.9	56.9±9.5	61.7±8.3	24.5±8.3	26.6±5.5	24.5±8.3	26.6±5.5	34.1±7.9*	42.5±11.7	47.8±12.2*	63.8±1.1*	42.5±11.7
	H s	51.6±11.1	55.6±12.9	63.7±13.8	27.9±4.6	31.2±6.1	27.9±4.6	31.2±6.1	37.6±8.9	45.2±9.6	69.9±12.3	80.6±9.6	45.2±9.6
	ns	34.4±2.8*	38.7±6.4	43.1±5.6*	6.4±3.4*	18.3±4.9*	6.4±3.4*	18.3±4.9*	22.6±9.6*	29.1±8.7*	48.4±8.7*	60.2±16.2*	29.1±8.7*
AMM	L s	41.6±9.1*	53.9±8.7	64.1±11.8	85.4±5.1	98.8±1.3	85.4±5.1	98.8±1.3	98.8±1.3	44.9±12.9	100±0	100±0	44.9±12.9
	ns	35.5±4.2*	38.9±10.8	51.1±6.4*	34.4±12.1	67.8±7.8	34.4±12.1	67.8±7.8	83.3±5.9	2.2±7.3*	47.8±10.9*	88.9±4.4	2.2±7.3*
	H s	33.4±9.5*	38.2±12.2	52.8±10.6*	49.4±13.6	83.1±10.5	49.4±13.6	83.1±10.5	93.3±3.1	56.2±20.8	57.3±20.3*	98.8±1.2	56.2±20.8
	ns	21.3±1.9*	25.8±6.9*	44.9±8.7*	11.2±6.7*	41.6±10.8	11.2±6.7*	41.6±10.8	73.0±7.8	41.6±14.4	55.1±10.3*	75.3±17.5	41.6±14.4
IX-F	L s	70.6±11.3	78.2±11.3	97.8±1.5	26.1±10.6	41.3±12.1	26.1±10.6	41.3±12.1	58.7±8.3	38.1±13.3	96.1±2.9	100±0	38.1±13.3
	ns	58.8±7.8	70.0±9.7	86.6±6.3	25.6±13.7	38.9±8.4	25.6±13.7	38.9±8.4	52.2±7.3	45.6±14.3	81.1±7.8	88.9±3.3	45.6±14.3
	H s	76.1±9.9	82.61±9.6	98.9±1.2	39.1±10.5	51.1±11.3	39.1±10.5	51.1±11.3	66.3±7.5	46.7±8.8	96.7±2.4	100±0	46.7±8.8
	ns	67.8±6.7	76.7±7.5	88.9±5.4	32.2±15.6	44.4±9.4	32.2±15.6	44.4±9.4	62.2±5.2	32.2±7.1	47.8±9.9	88.9±4.3	32.2±7.1

Tabella 3. Incidenza percentuale del damping-off causato da *P. ultimum*, *R. solani* e *S. minor* su *L. sativum* rilevata in saggi *in vivo* condotti sui substrati di coltivazione, torba sterile + compost (*a, b, c, d, e*), quest'ultimo usato a dose bassa (L) ed alta (H), e torba (*g, f*), con l'aggiunta di miglio infetto nella concentrazione di 0.3 (D1), 1 (D2) e 3% (D3) (p.vol.). Gli esperimenti sono stati condotti su materiali tal quali (ns) e preventivamente sterilizzati con il calore (s). I numeri seguiti dall'asterisco (*) indicano una significativa ($P < 0,05$) riduzione della malattia rispetto al controllo inoculato ma non ammendato (substrato g, sterile).

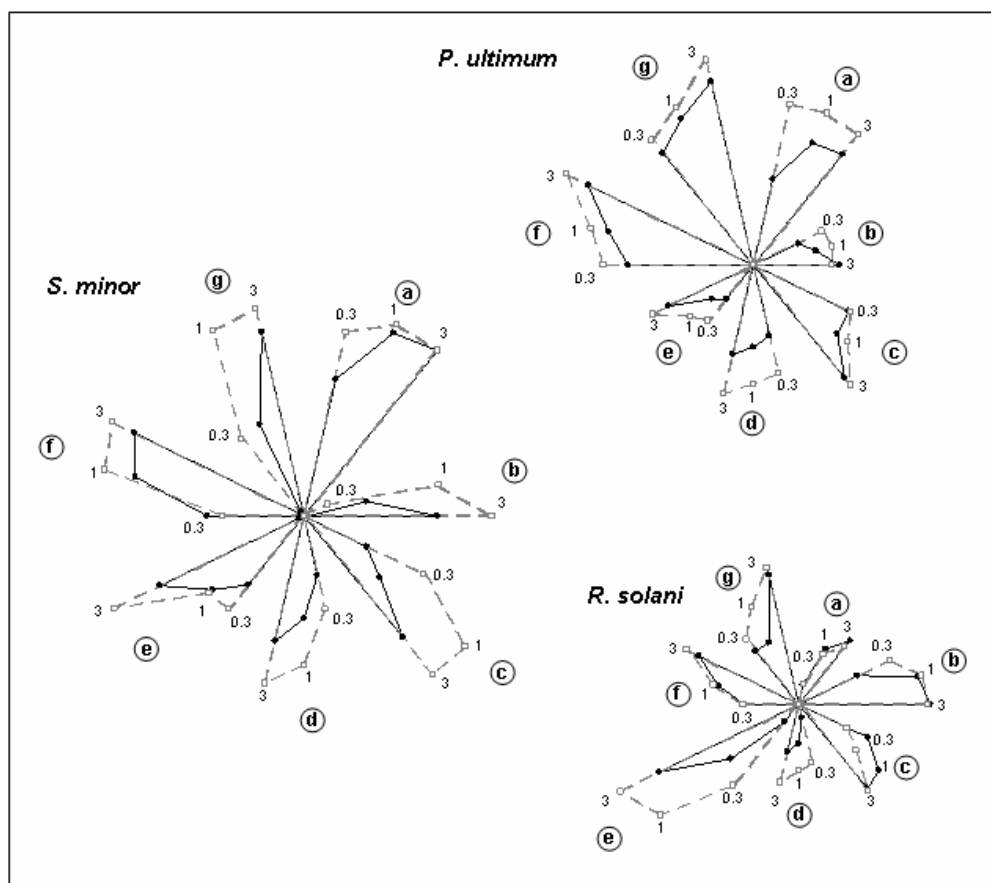


Figura 1. Rappresentazione grafica dell'incidenza percentuale del damping-off causato da *P. ultimum*, *R. solani* e *S. minor* su *L. sativum* rilevata nei saggi *in vivo* condotti sui substrati di coltivazione: torba sterile + compost al 20% (a, b, c, d, e) e torba (g, f), con l'aggiunta di miglio infetto alle dosi di: 0, 0.3, 1 e 3% p.vol. L'incidenza della malattia osservata, per ogni substrato, è proporzionale alla distanza dal centro della figura di ciascun punto segnato con la relativa dose di inoculo utilizzata. Le linee scure esprimono i risultati rilevati negli esperimenti realizzati sui materiali non sterilizzati. Le linee chiare, invece, esprimono i risultati rilevati negli esperimenti realizzati sui materiali preventivamente sterilizzati.

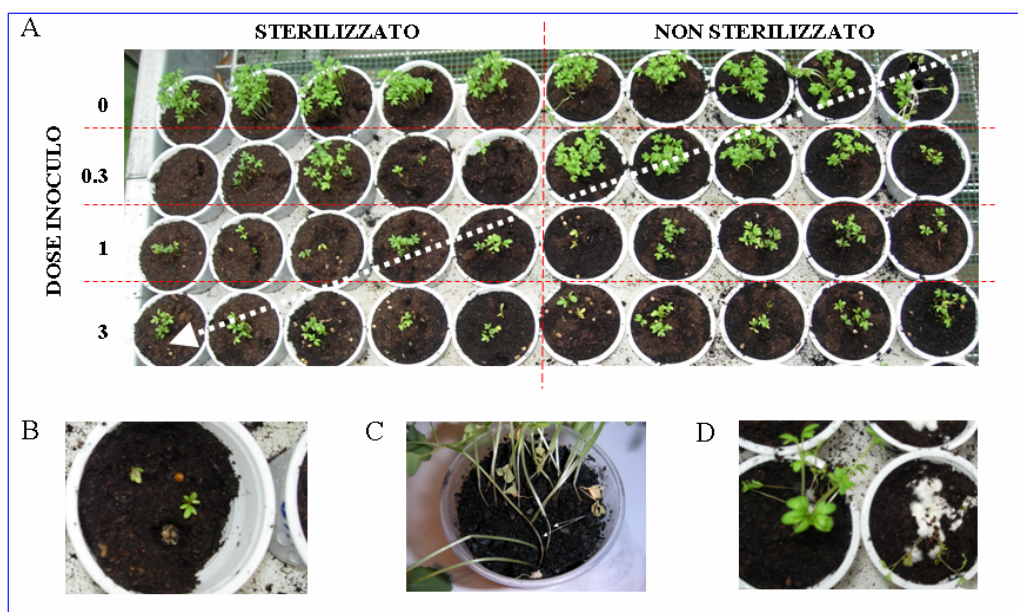


Figura 2. In A, saggio in allestimento per la valutazione dell'incidenza del damping-off su *L. sativum* (A). La freccia bianca tratteggiata è in direzione dell'aumento della malattia. In B, C e D, sono mostrati i sintomi delle malattie causate, rispettivamente, da *P. ultimum*, *R. solani* e *S. minor*.

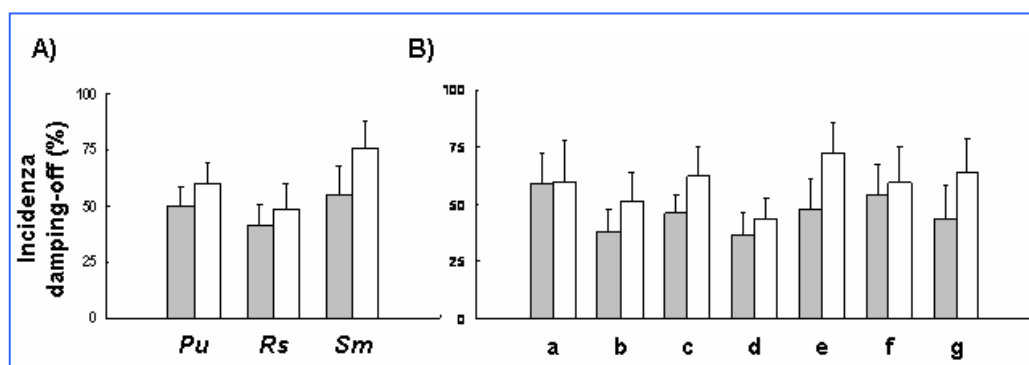


Figura 3. Effetto sterilizzazione sull'incidenza totale della malattia causata da *P. ultimum* (Pu), *R. solani* (Rs) e *S. minor* (Sm) su *L. sativum*, osservata nei saggi *in vivo* condotti sui substrati di coltivazione (a, b, c, d, e, f, g), sterili (barre chiare) e non (barre scure). Nei grafici l'incidenza totale è riportata per fungo (A), e per materiale (B).

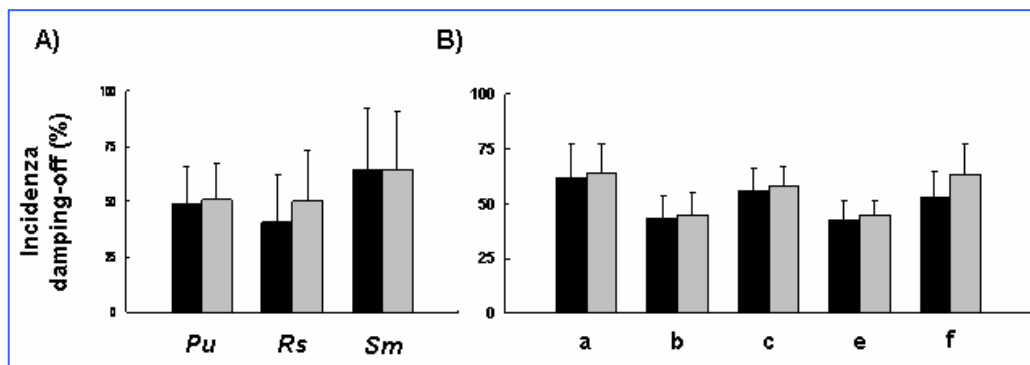


Figura 4. Effetto dose di ammendante sull'incidenza totale della malattia causata da *P. ultimum* (*Pu*), *R. solani* (*Rs*) e *S. minor* (*Sm*) su *L. sativum*, osservata nei saggi *in vivo* condotti sui substrati (a, b, c, d, e, f, g), ammendati al 10% (barre chiare) ed al 20% (barre scure). Nei grafici l'incidenza totale è riportata per fungo (A), e per materiale (B).

3.2 Valutazione della fitotossicità e della crescita fungina sugli estratti acquosi

I risultati del biosaggio per la valutazione della fitotossicità sono riportati in **figura 5**. La lunghezza radicale dei germinelli di *L. sativum* risulta influenzata in maniera differente dalla matrice degli estratti acquosi utilizzati. I test in cui sono stati utilizzati estratti dei compost *b*, *c* e *d* hanno rivelato un consistente effetto di inibizione della crescita radicale. Il compost *c* risulta, in assoluto, il più fitotossico, mostrando un'inibizione della radicazione pari al 55%, alla concentrazione più bassa dell'estratto acquoso, e un'inibizione totale alle concentrazioni meno diluite. Anche i compost *d* e *b* hanno causato effetti fitotossici relativamente alti. Gli estratti dei compost

a ed *e*, invece, hanno mostrato media fitotossicità, causando una riduzione della crescita lieve, per le concentrazioni basse e più marcata (<50%) a quelle più alte. Gli estratti delle torbe, invece, hanno mostrato una induzione della radicazione delle piantine rispetto al controllo.

I risultati, invece, relativi allo sviluppo saprofitario dei patogeni sugli estratti, sono riportati in **figura 6**. Sono state rilevate differenze significative nella capacità dei patogeni fungini di utilizzare gli estratti acquosi dei materiali organici saggiati; gli estratti dei compost saggiati in forma non sterile, hanno determinato sempre una riduzione dello sviluppo saprofitario dei tre funghi rispetto al controllo.

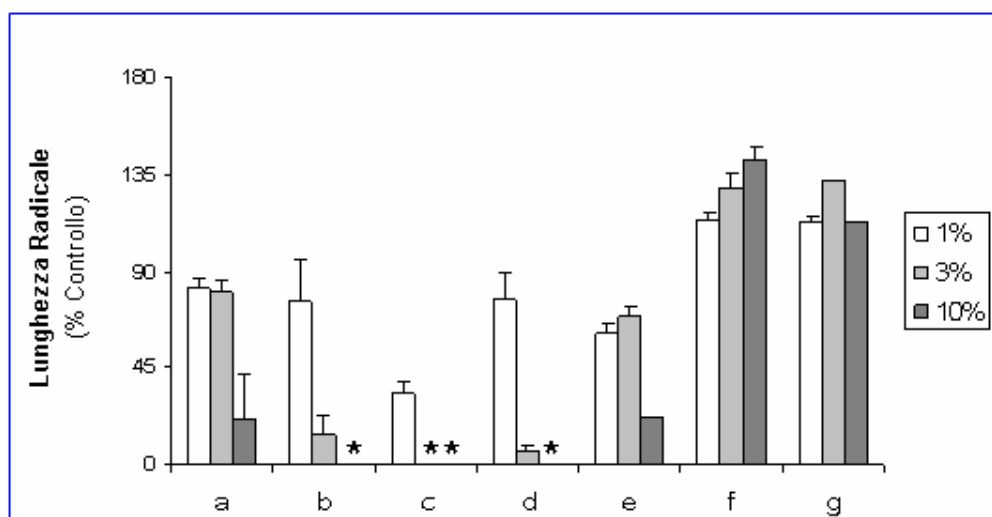


Figura 5. Lunghezza radicale dei germinelli di *Lepidium sativum* fatti sviluppare sugli estratti acquosi dei materiali (a, b, c, d, e, f, g) espressa in percentuale rispetto al controllo su acqua. Le barre bianche, grigie e nere esprimono i risultati riferiti alle tre concentrazioni degli estratti utilizzate, rispettivamente, 1, 3 e 10%.

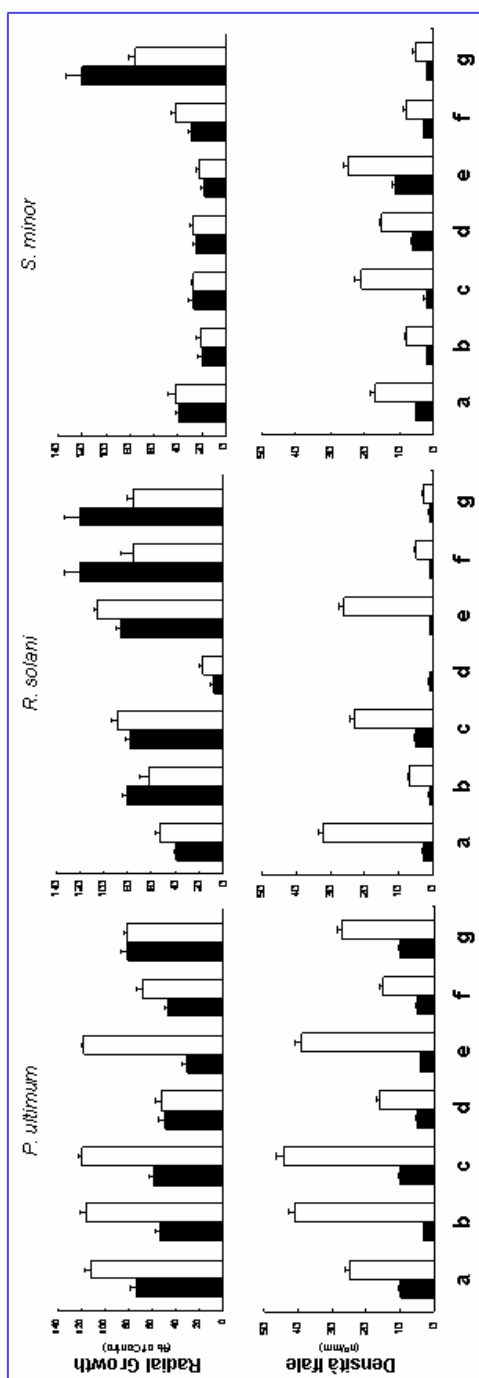


Figura 6. Sviluppo miceliare radiale (espresso in percentuale del controllo) e misura della densità ifale (espressa come n° di ife per mm) dei tre patogeni fatti crescere sugli estratti acquosi dei materiali (a, b, c, d, e, f, g). Le barre scure e chiare esprimono, rispettivamente, i risultati rilevati negli esperimenti realizzati su estratti tal quali e preventivamente sterilizzati.

Per le torbe si è verificato il contrario: i funghi sono riusciti a svilupparsi anche sugli estratti non sterili. *S. minor* ha mostrato difficoltà di crescita sugli estratti, riducendo della metà il proprio sviluppo nell'85% dei casi. *R. solani* non ha mostrato differenze significative nella capacità di crescita radiale sugli estratti sterili e non. *P. ultimum* ha risentito in maniera chiara e marcata della componente biotica presente negli estratti. Il saggio di crescita radiale ha consentito di rilevare una forte inibizione nello sviluppo fungino sugli estratti del compost *d*, in tutti i casi. La densità ifale ha risentito sempre della componente biotica.

3.3 ¹³C CPMAS NMR

Le informazioni spettrali ottenute dagli spettri ¹³C CPMAS-NMR delle torbe e dei compost sono riportate in **figura 7**, mentre la distribuzione del carbonio organico nelle diverse frazioni, sono riassunte in **tabella 4**.

I diversi gruppi di C sono classificati, separando le regioni spettrali (chemical shift regions) in quattro grossi gruppi, come segue: alchil C (0–45 ppm), O-alchil C (45–110 ppm), C aromatici (110–160 ppm), e C carbonilico (160–190 ppm) (Genevini *et al.*, 2002; Inbar *et al.*, 1992 ; Maie *et al.*, 2002). Il segnale nell'intervallo 0-46 ppm (C Alchilico) è attribuito ai carboni

alchilici, come i carboni metilenici (CH₂)_n- ed i gruppi metili terminali CH₃ dei lipidi lineari di origine vegetale, come le cere e i biopoliesteri. I picchi a circa 30 ppm sono stati ascritti alla presenza di biopoliesteri alifatici a lunga catena (Knicker & Skjemstad, 2000), visibilmente pronunciati nello spettro delle torbe ed in quello del compost *e*. La presenza del picco a 40 ppm, ben visibile nello spettro del compost *c*, può indicare anche gruppi alchilici ramificati. Il segnale nell'intervallo 46-66 ppm è invece assegnato ai carboni alifatici (N-alchil) del tipo C-N come negli amminoacidi o peptidi. Il picco a 56 ppm è attribuito a gruppi metossilici lignino-derivati (Said-Pullicino *et al.*, 2007). Il segnale negli intervalli 66-92 (O-alchil) e 92-111 (di-O-alchil) ppm è invece assegnato, rispettivamente ai carboni C-O come negli alcoli e nei carboidrati. L'intenso segnale intorno ai 72 ppm corrisponde alla sovrapposizione delle risonanze dei carboni C2, C3 e C4 nei monomeri della cellulosa e dell'emicellulosa, mentre il segnale a 106 ppm, 65 ppm e le spalle a 82-85 ppm sono assegnati, rispettivamente, al carbonio anomerico C1 ed ai carboni C6 e C4 (Atalla & VanderHart, 1999; Celi *et al.*, 1997; Six *et al.*, 2001). La risonanza nell'intervallo 111-164 ppm è assegnata invece ai carboni aromatici. All'interno di questo range i segnali a circa 120 ppm sono caratteristici di composti aromatici protonati, quelli a 130 ppm, ben visibile nello spettro del compost *c*, sono assegnati a composti aromatici C-sostituiti,

mentre quelli a 150 ppm sono assegnati a composti aromatici O-sostituiti (O-aril o C fenolici). I segnali tra 167 e 192 ppm sono dovuti ai gruppi carbossilici inclusi i sali, gli acidi liberi, e gli esteri. Il picco a 175 ppm è attribuito ai carboni carbossilici. La regione spettrale assegnata ai polisaccaridi costituisce circa il 40% di ciascun campione, con un minimo di 36% per il compost *c* ed un massimo di 46% per il compost *e*. L'area assegnata ai carboni carbossilici ed agli N-alchlici nei compost è maggiore della stessa rinvenuta nelle torbe. Infine il contenuto di gruppi C-N e -COOH è in accordo con il contenuto dell'azoto verificato con l'analisi elementare. La distribuzione del C organico tra le regioni spettrali ha consentito di calcolare l'indice di idrofobicità (**tabella 5**).

<i>ppm</i>	<i>188-164</i>	<i>164-141</i>	<i>141-111</i>	<i>111-92</i>	<i>92-66</i>	<i>66-46</i>	<i>46-0</i>
materiali	carboxyl/ amide	O-aryl	aryl	di-O-alkyl	O-alkyl	methoxyl, N-alkyl	alkyl
a	5,7	5,9	13,5	10,0	32,4	16,3	16,3
b	6,1	3,7	10,2	9,6	33,4	16,2	20,7
c	6,1	4,7	15,5	9,4	27,1	16,1	21,1
d	5,6	4,0	9,9	10,7	33,2	18,9	17,6
e	5,9	4,8	11,4	10,7	36,2	11,7	19,3
f	3,3	6,4	12,4	10,6	30,7	12,1	24,5
g	3,7	6,4	13,2	10,7	31,5	11,6	22,9

Tabella 4. ¹³C CPMAS - Distribuzione Del Carbonio Organico (%).

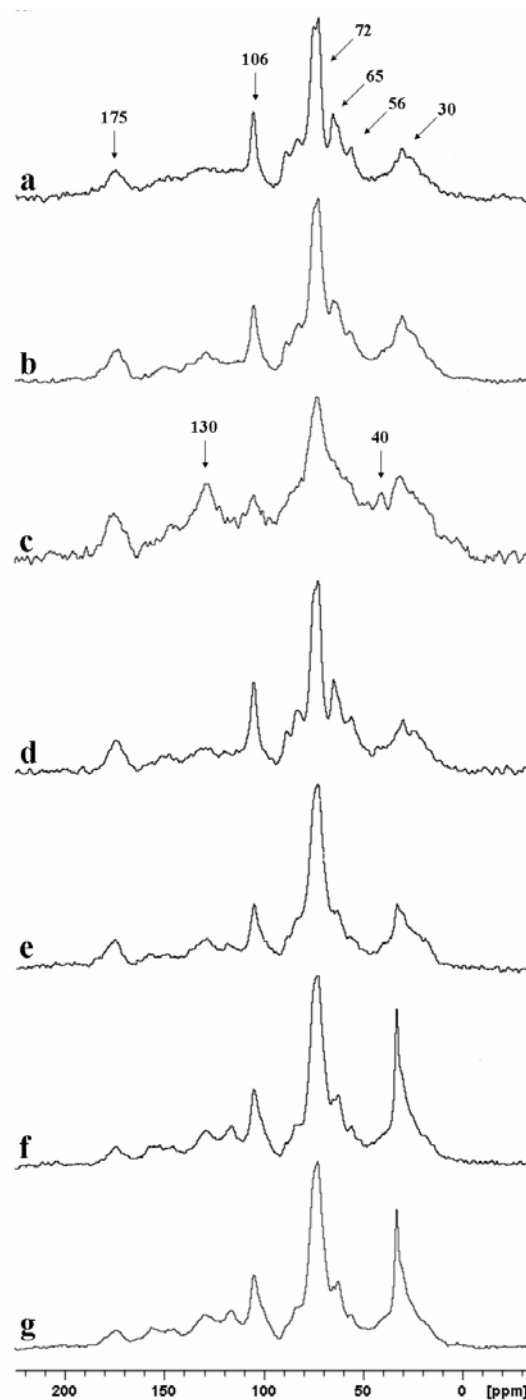


Figura 7. Spettri ^{13}C -CPMAS-NMR dei materiali organici riportati in tabella 1 ed indicati con le lettere: *a, b, c, d, e, f, g*.

<i>ppm</i>	0-60 + 110-160	60-110 + 160-200	<u>C Idrofobico*</u> C Idrofilico
sample	C Idrofilico	C Idrofobico	
a	48.1	51.9	1.079
b	49.1	50.9	1.036
c	42.6	57.4	1.347
d	49.5	50.5	1.020
e	52.8	47.2	0.893
f	44.6	55.4	1.242
g	45.9	54.1	1.178

Tabella 5. Calcolo dell'indice di idrofobicità (*), come rapporto tra il C idrofilico ed il C idrofobico, osservati, rispettivamente nelle aree spettrali ^{13}C -CPMAS-NMR: 0-60 + 110-60, e 60-110 + 160-200.

Materiali	^{31}P chemical shift (<i>ppm</i>)	possibile attribuzione
a	1,0	PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-
b	1,9	HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-
c	1,9	HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-
d	5,0; 2,5	HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-
e	1,5	HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-
f	-1,5	
g	-1,1; -2,9	$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$

Tabella 6. ^{31}P DPMAS, chemical shift e possibile attribuzione.

3.4 ^{31}P PDMAS NMR

Le informazioni spettrali ottenute dagli spettri ^{31}P PDMAS-NMR delle torbe e dei compost sono riportate in **figura 8**. I valori di ^{31}P chemical shift, con la possibile attribuzione dei picchi, sono riportati in **tabella 6**. In questi esperimenti, non sono stati rilevati picchi attribuibili a P organico. Nessuna differenza di rilievo, inoltre, è stata riscontrata tra i diversi campioni, se non quella che le torbe, al contrario dei compost, presentano un chemical shift inferiore a zero.

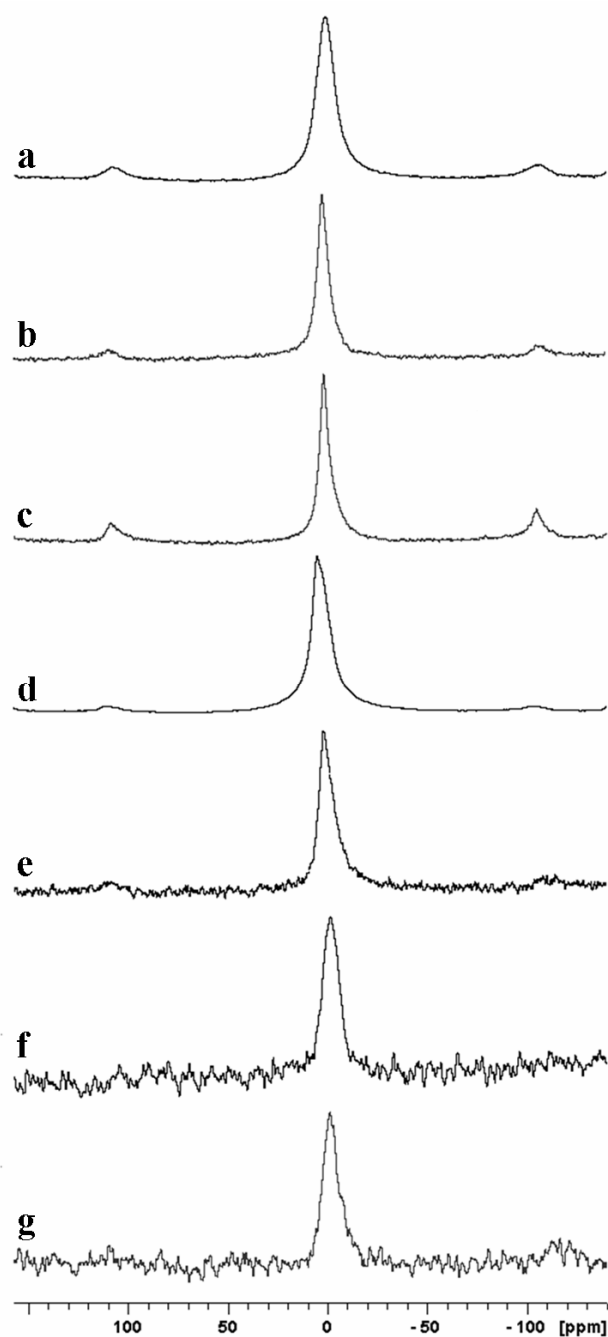


Figura 8. Spettri ^{31}P -PDMAS-NMR dei materiali organici riportati in tabella 1 ed indicati con le lettere: *a, b, c, d, e, f, g*.

3.5 Popolazioni microbiche

I risultati di tali esperimenti sono riportati in **figura 9**. Sono state trovate differenze significative nelle popolazioni di funghi e batteri totali nei materiali organici saggiati. Nei compost originati da rifiuti urbani *c* e *b* le popolazioni fungina e batterica sono significativamente più alte rispetto agli altri campioni. In particolare, il compost *c* mostra le più elevate dimensioni delle due popolazioni microbiche esaminate ($>10^7$ ufc per i funghi e 10^9 ufc per i batteri).

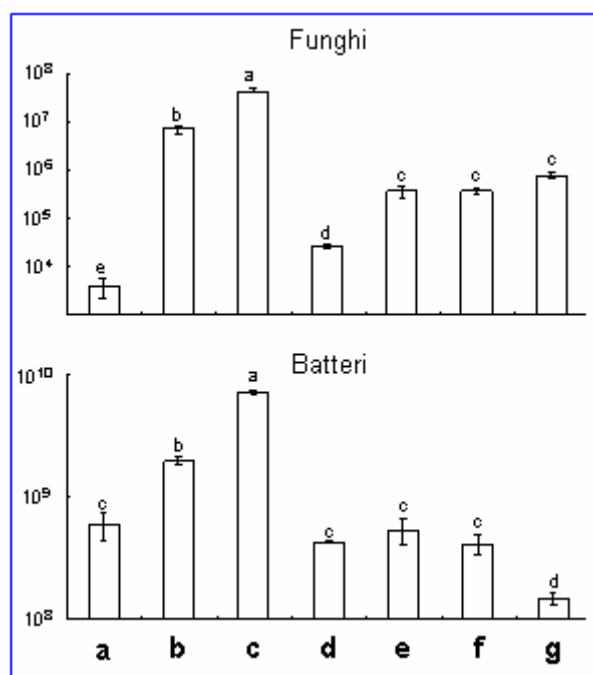


Figura 9. Livelli di popolazione di funghi totali e batteri totali (espressi in ufc/gr) rilevati nei materiali organici (a, b, c, d, e, f, g).

3.6 Attività enzimatiche

I valori dell'attività di idrolisi della fluoresceina di acetato (FDA) e quelli delle attività glucanolitica (glucanasi), N-acetilglucosamminica (NAGasi) e chitobiosidasica (Biasi) delle comunità microbiche presenti nei materiali organici sono riportati in **figura 10**.

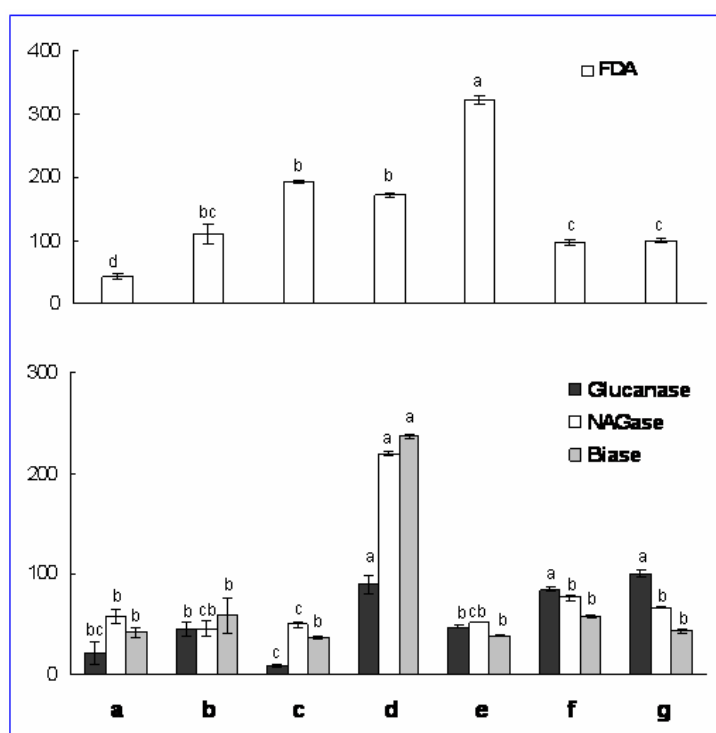


Figura 10. Livelli di attività enzimatica (FDA, Glucanasi, NAGasi e Biasi) relativa alle comunità microbiche residenti nei materiali organici (a, b, c, d, e, f, g) ed espressa come unità di attività/g. I livelli di ciascuna attività sono stati confrontati statisticamente tra loro.

La microflora residente nel compost *d* mostra i valori più elevati delle tre attività saggiate. In tale compost, i valori di attività N-acetilglucosamminica (Nagasi) e chitobiosidasica (Biasi) sono risultati circa cinque volte più alti degli stessi rilevati mediamente negli altri campioni. In questi ultimi, le attività Nagasi e Biasi mostrano valori equivalenti. Per l'attività glucanolitica, i valori più alti sono stati rilevati ancora per il compost *d*, questa assieme alle torbe. Viceversa i compost *a* e *c* hanno mostrato i livelli più bassi.

Per quanto concerne l'attività idrolitica della fluoresceina diacetato operata dalle comunità microbiche presenti nei materiali organici, la microflora residente nel compost *e* ha mostrato i valori più elevati. Seguono per i livelli di attività i campioni relativi al compost *c* e *d*.

3.7 BIOLOG

Sono stati rilevati effetti significativi della matrice del materiale organico sulla diversità metabolica della comunità microbica in esso residente, posta in coltura in un sistema Biolog. In particolare è stato trovato che l'AWCD, l'indice di Shannon-Weaver (H') e la Versatilità Catabolica risultano più bassi per le comunità microbiche estratte dalle torbe, rispetto a quanto succede per le comunità estratte dai compost. Visualizzando in

grafico (**figura 11**), per ciascun materiale, i valori dei tre indici rispetto al tempo, è possibile osservare differenze fra i campioni sia nei valori finali medi raggiunti, che nelle cinetiche di sviluppo. La determinazione temporale di questi indici consente di osservare l'attitudine metabolica delle comunità microbiche nella loro risposta sia nel breve (24 h) che nel medio periodo (96 h). Tale considerazione evidenzia che con l'aumentare del tempo di durata del saggio, si assottigliano le differenze di attività generale tra i diversi campioni e che, con il tempo, varia il rango delle comunità microbiche rispetto all'attività rilevata con l'AWCD. Questo accade anche con l'elaborazione dei dati di assorbanza dei pozzetti delle piastre Biolog per l'elaborazione degli indici H' e VC.

I valori di AWCD rilevati per le comunità dei compost *b* ed *a* sembrano raggiungere il plateau già a 72 h dall'inoculo, mentre per gli altri campioni, tra 72 e 96 h si evidenzia uno sviluppo ulteriore.

L'Indice H' non mostra differenze significative tra le comunità isolate dai compost, ma, comunque, permette di separare questi ultimi dalle torbe. La stima della diversità funzionale, applicata ai compost nei quali la carica microbica è particolarmente elevata, risulta, in generale, poco indicativa ai fini di una separazione dei campioni, dal momento che si tratta di un parametro che permette di apprezzare differenze in presenza di una bassa

attività complessiva. A tempi di incubazione bassi, si hanno i valori più bassi di H' , indicando un basso numero di substrati differenti utilizzati da ciascuna comunità. A tempi di incubazione alti, il valore di H' aumenta per tutti i campioni e, contemporaneamente, si appiattiscono le differenze tra essi.

L'aumento di attività delle comunità microbiche nel corso del saggio viene confermato anche dall'indice di Versatilità Catabolica. Tale indice consente più dei precedenti di separare le comunità dei compost.

Differenze nei tempi di raggiungimento e nelle dimensioni dei valori dei tre indici elaborati sono coerenti con la differente cinetica nello sviluppo del colore. Quest'ultimo è ascrivibile sia alle differenze nell'attività metabolica generale delle comunità microbiche dei materiali saggiati, che delle capacità specifiche di utilizzazione dei 31 composti del Biolog, come evidenziato dai valori ASCA, elaborati secondo Guckert *et al.* (1996) (**tabella 7**).

Un ulteriore confronto tra i campioni sulla base degli indici di diversità, al netto degli effetti del tempo di incubazione, è stato eseguito, come indicato da Harch *et al.* (1997) a valori di attività microbica totale (AWCD) costanti. Nel confronto secondo Harch tra i campioni saggiati, la comunità microbica delle torbe e dei compost *b* e *d* mostrano i valori più alti di diversità funzionale (H'), mentre potenzialità degradative (VC) più elevate sono registrate per le torbe ed il compost *e*.

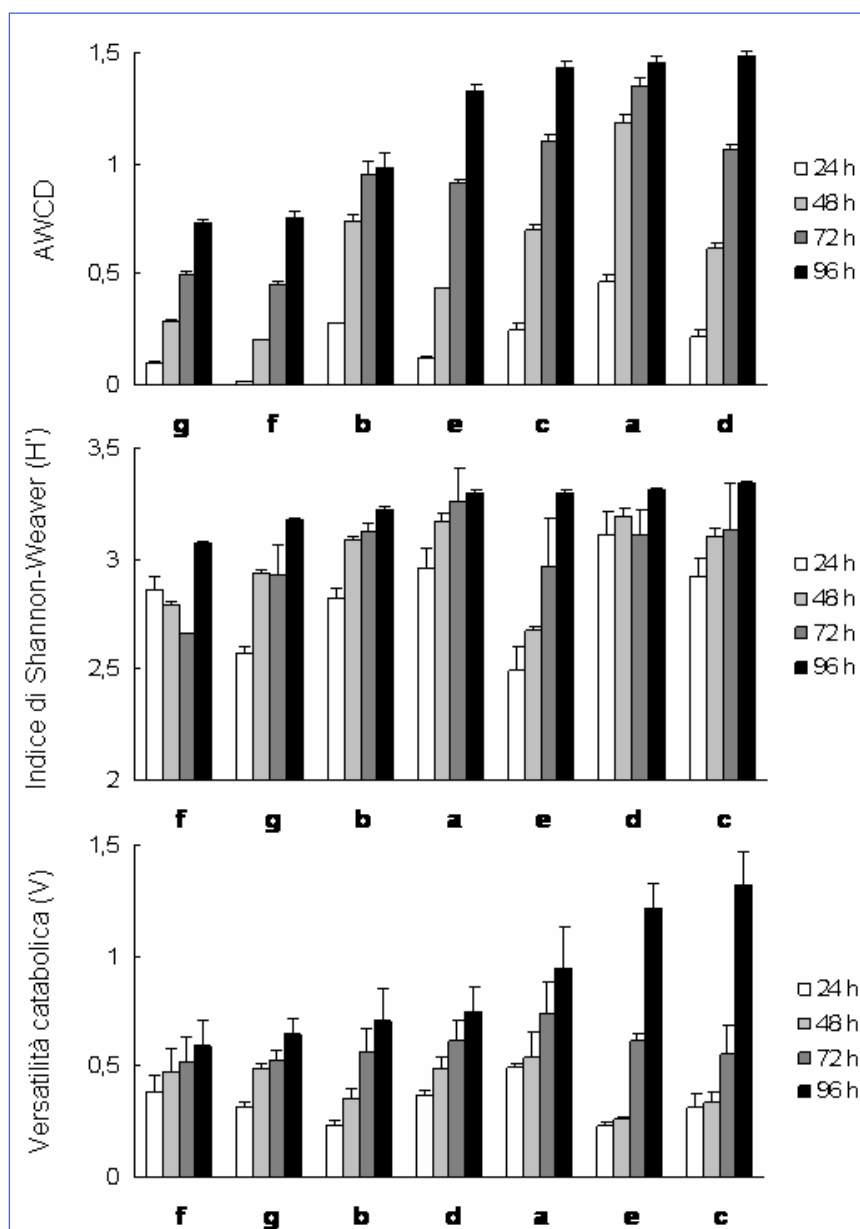


Figura 11. Livelli degli indici di AWCD, Shannon-Weaver H' e Versatilità Catabolica, rilevati per le comunità microbiche presenti nei materiali organici (a, b, c, d, e, f, g), nel saggio Eco Plate Biolog, ad intervalli regolari di 24 ore, fino a 96 h. I materiali sono stati ordinati sul relativo asse, secondo valori crescenti degli indici menzionati.

BIOLOG: CINETICHE DI SVILUPPO DEL COLORE (%)								
Gruppi	Substrati	Materiali						
		a	b	c	d	e	f	g
Ammine	G4 Phenyletyl-amine	16,0	84,5	100	43,3	70,4	56,2	75,8
	H4 Putrescine	100	39,6	32,9	57,1	8,1	4,3	21,6
		100	69,3	68,9	70,1	34,4	25,4	49,1
Aminoacid.	A4 L-Arginine	100	8,5	57,1	14,6	20,1	3,8	26,0
	B4 L-Asparagine	96,3	78,2	100	59,1	84,8	21,0	36,3
	C4 L-Phenylalanine	89,7	90,9	66,9	85,0	100	55,7	60,3
	D4 L-Serine	100	59,9	92,6	52,7	38,2	15,3	10,9
	E4 L-Threonine	57,7	24,3	46,7	100	53,5	12,1	46,8
	F4 Glycil-L-Glutamic Acid	75,6	45,4	44,0	100	29,0	23,1	9,0
		70,6	39,5	44,7	100	35,7	20	19,5
Fenolici	C3 2-Hidroxy Benzoic Acid	79,0	63,9	100	32,4	46,5	15,4	5,0
	D3 4-Hidroxy Benzoic Acid	100	37,9	47,5	32,7	43,4	10,7	30,1
		100	41,2	53,5	33,3	44,5	11,3	28,2
Polimeri	C1 Tween 40	97,2	100	83,5	78,2	82,0	17,5	62,8
	D1 Tween 80	100	53,6	66,9	80,4	68,4	20,4	56,5
	E1 a-Cyclodextrine	24,1	100	90,4	57,5	62,1	0,7	2,3
	F1 Glycogen	100	85,1	59,6	88,6	86,0	23,5	2,8
		70,4	100	80,3	80,6	81,4	14	2,81
Carboidrati	G1 D-Cellobiose	100	67,4	66,5	73,0	44,9	32,7	23,8
	H1 a-D-Lactose	60,7	49,5	53,7	100	34,4	2,6	12,9
	A2 b-Methyl-D Glucoside	100	17,3	45,8	30,3	13,8	7,4	18,1
	B2 D-Xylose	100	50,4	53,6	65,0	24,8	17,6	25,9
	C2 i-Erythritol	89,8	29,3	100	57,9	60,0	45,6	26,4
	D2 D-Mannitol	100	68,7	80,0	67,9	77,6	19,0	44,0
	E2 N-Acetil-Dglucosamine	100	83,9	69,0	52,5	39,2	39,2	23,6
	G2 Glucose-1-Phosphate	100	20,5	29,8	39,4	31,6	0,8	42,6
	H2 D,L-a-Glycerol Phosphate	90,8	29,3	73,0	100	3,2	8,8	0,0
	A3 D-Galactonic Acid g-Lact.	100	42,1	37,3	28,5	65,2	73,9	15,0
		100	40	46	45	52,6	60,8	11,9
Acidi Carbossilici	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	91,7	85,6	99,7	57,0	100	63,5	10,7
	F2 D-Glucosaminic Acid	22,5	35,2	100	48,4	32,0	3,9	98,5
	B3 D-Galacturonic Acid	86,8	100	93,7	50,6	83,9	24,7	54,7
	E3 g-Hydroxybutyric Acid	100	41,0	53,3	58,8	47,8	44,3	1,2
	F3 Itaconic Acid	81,0	33,6	25,2	100	35,9	71,3	20,5
	G3 a-Ketobutyric Acid	46,8	47,3	73,5	100	53,8	6,8	51,9
	H3 D-Malic Acid	44,0	87,4	72,6	100	46,8	33,8	73,4
		32,6	52,8	52,8	100	35,7	17,4	47,5

Tabella 7. Attività metabolica delle comunità microbiche residenti nei materiali (a, b, c, d, e, f, g) misurata mediante Biolog. In tabella sono riportati i valori dell'area sottesa alla curva di assorbanza, che descrive la cinetica di sviluppo del colore nei pozzetti contenenti ognuna delle fonti di carbonio, ordinate in distinti gruppi molecolari. I numeri sono percentuali del valore massimo (fatto 100) di ogni riga.

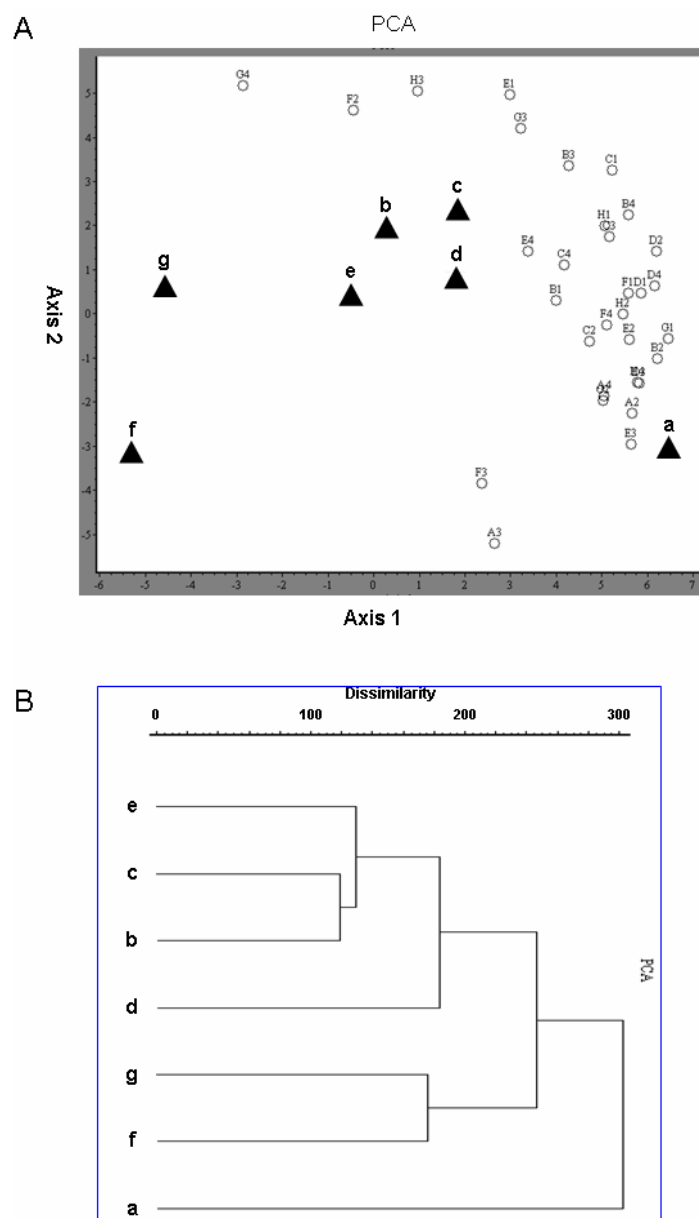


Figura 12. Matrice dell'analisi per componenti principali (PCA) dei valori delle cinetiche di sviluppo del colore, relative a ciascuna fonte di carbonio, rilevati per le comunità microbiche saggate (A). Dendrogramma di separazione delle comunità microbiche, in cluster di omogeneità rispetto ai livelli di utilizzazione delle diverse fonti di carbonio (B).

L'analisi in componenti principali ha consentito di individuare, sulla base del profilo di utilizzo dei substrati, i rapporti esistenti tra i campioni (**figura 12**). In un dendrogramma di dissimilarità, i campioni saggiati si distribuiscono formando cluster sulla base della stessa matrice di origine da cui sono stati prodotti.

3.8 Relazioni tra i parametri misurati per ciascun ammendante organico

L'incidenza del damping-off rilevata nelle prove con substrato non sterilizzato e quella, invece, registrata sui materiali preventivamente trattati con calore, è correlata negativamente alla concentrazione di carbonio organico O-alchilico e, viceversa, positivamente al relativo indice di idrofobicità (**figura 13**). Inoltre, la malattia è correlata negativamente con i valori di AWCD e N totale (**figura 14**). Le regressioni tra i parametri N totale, AWCD, proteine totali con la concentrazione di carbonio organico carbossilico ed N-alchilico sono riportate nella **figura 15**. Diversi altri parametri misurati sono tra loro significativamente correlati.

In **tabella 8**, vengono riportati in matrice i coefficienti di correlazione secondo Pearson.

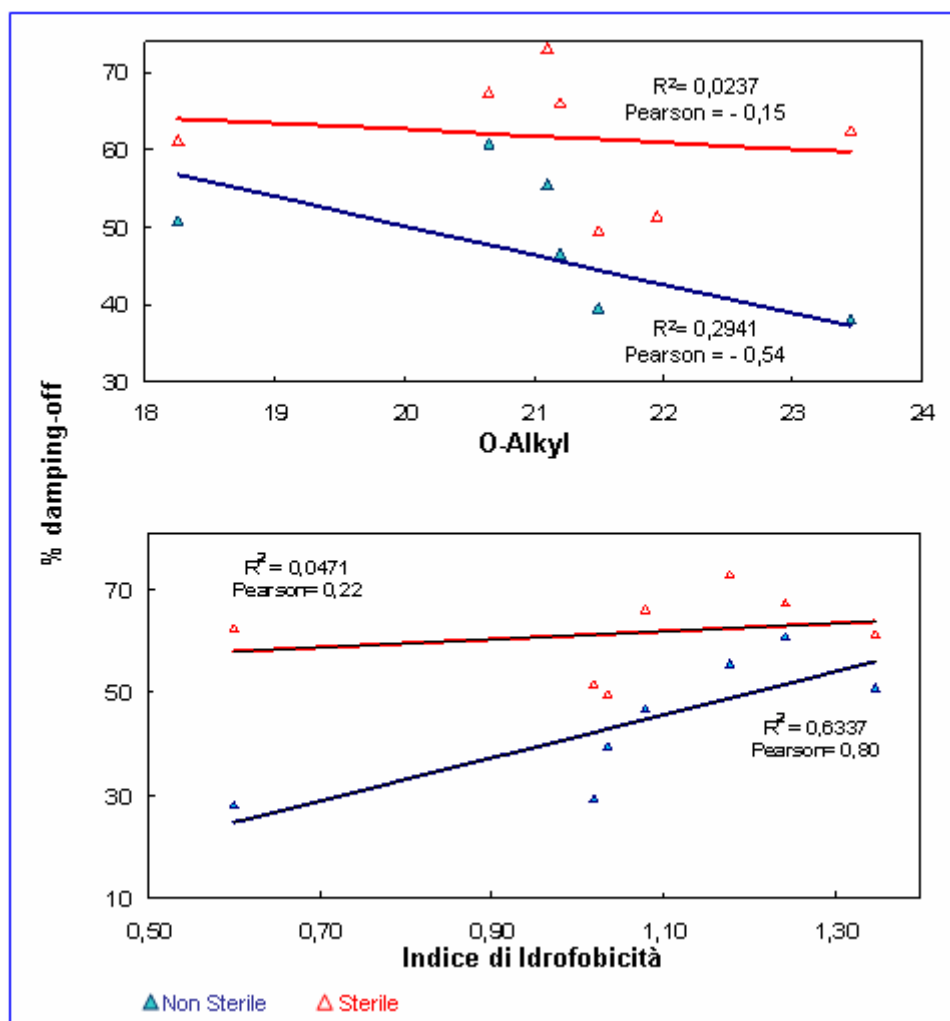


Figura 13. Regressione tra i livelli di incidenza percentuale del damping-off, rilevato sui substrati sterili (triangoli chiari) e non sterili (triangoli scuri), e la concentrazione dei gruppi O-alchilici (A) nel carbonio organico totale ed il suo grado di idrofobicità (B).

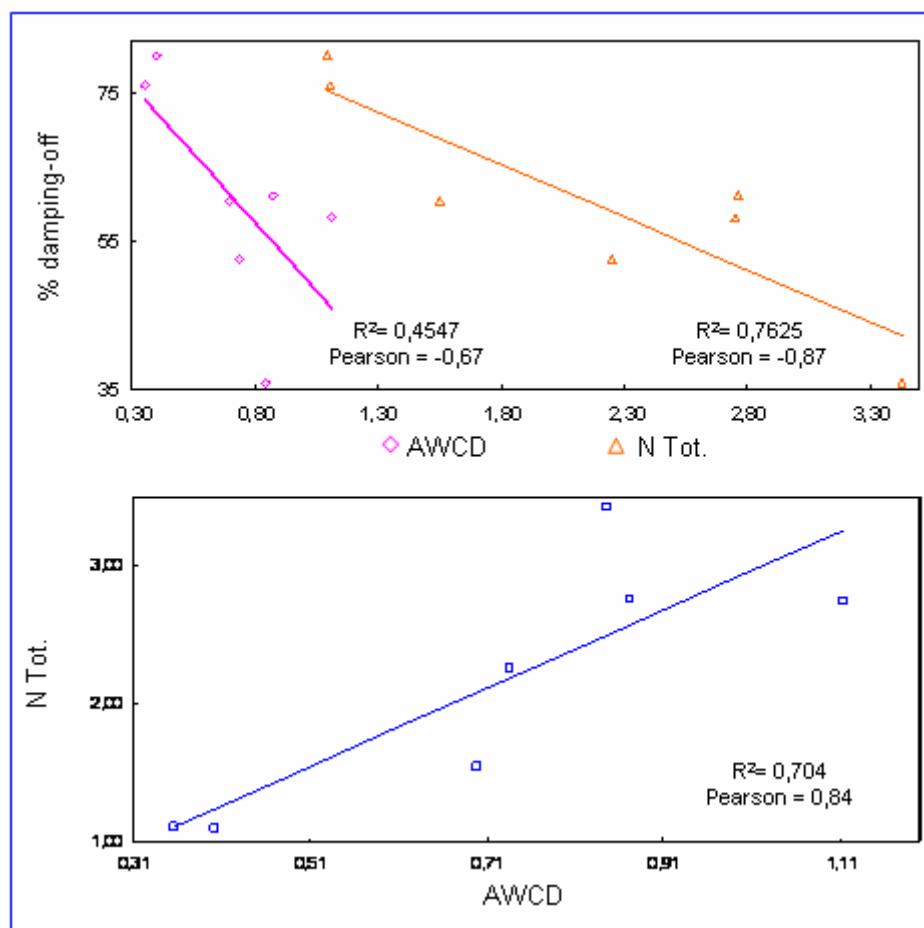


Figura 14. Regressione tra i livelli di incidenza percentuale del damping-off, rilevato sui substrati non sterili ed il loro contenuto in N totale (triangoli) ed i livelli AWCD (rombi) fatti rilevare dalle comunità microbiche residenti (A). Regressione tra il contenuto in N totale dei materiali ed i livelli AWCD (rombi) fatti rilevare dalle comunità microbiche residenti (B).

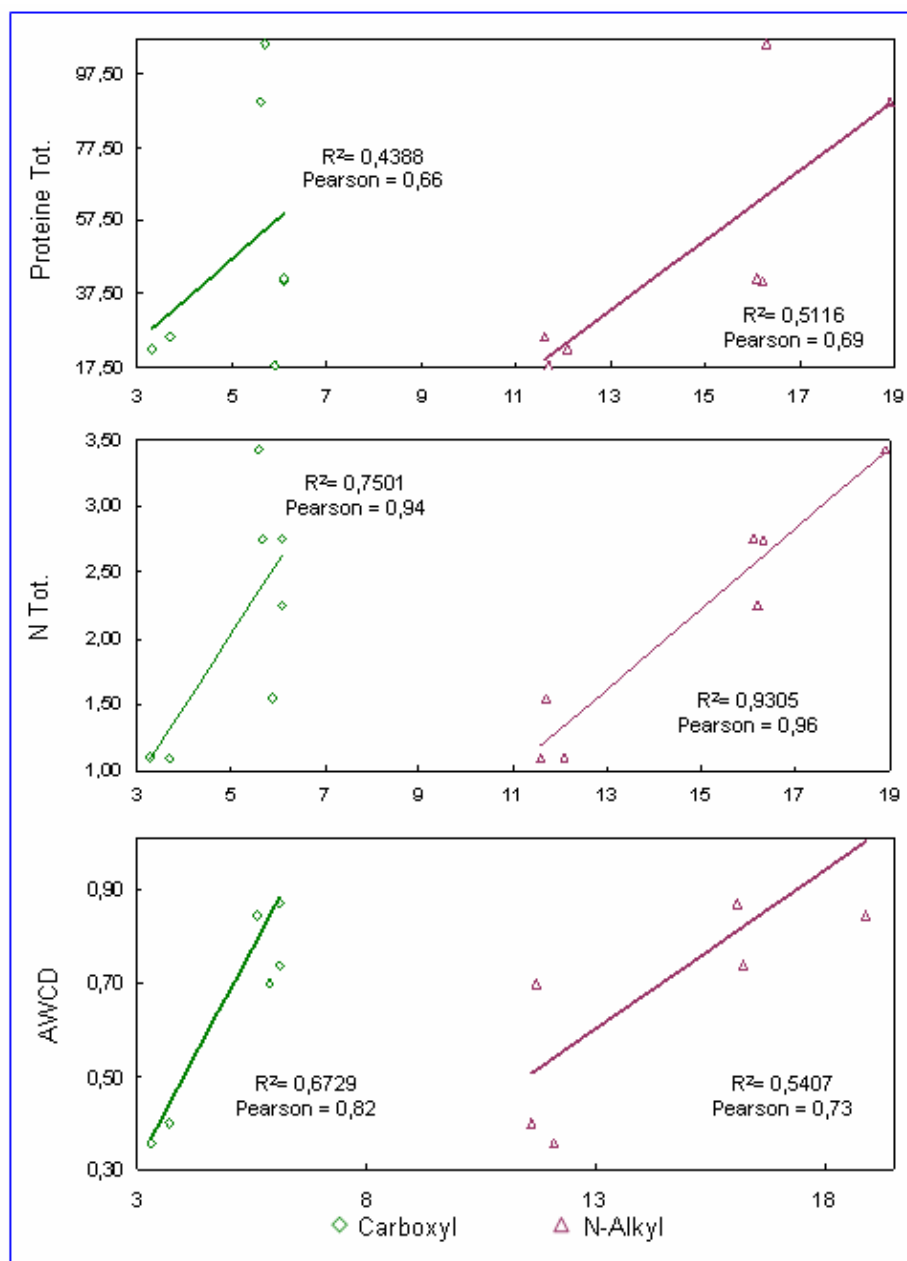


Figura 15. Regressione tra la concentrazione dei gruppi N-alchilici (triangoli) e carbossilici (rombi) nel carbonio organico totale; regressione tra la concentrazione di proteine totali (A), il contenuto di N totale (B) ed i livelli AWCD fatti rilevare dalle comunità microbiche residenti (C).

	carboxyl	N-alkyl	Tot. N	Org. N	TOC	pH	EC	VC	H ⁺	AWCD	Gluc	Fda	NA Gase	Blase	PuDO	RsDO	SmDO
carboxyl	.	0,62	0,71	0,75	0,75	0,91	0,69	0,67	0,87	0,79	-0,72	0,39	-0,01	0,10	-0,81	-0,10	-0,82
N-alkyl		.	0,96	0,97	0,97	0,86	0,72	0,08	0,59	0,66	-0,29	-0,19	0,55	0,83	-0,53	-0,78	-0,82
Tot. N			.	0,99	-0,45	0,88	0,71	0,30	0,76	0,83	-0,41	-0,02	0,52	0,59	-0,56	-0,76	-0,84
Org. N				.	-0,53	0,92	0,67	0,26	0,74	0,80	-0,45	-0,08	0,45	0,54	-0,60	-0,72	-0,84
TOC					.	0,92	0,67	0,26	0,74	0,80	0,74	-0,19	0,24	0,14	-0,60	-0,72	-0,84
pH						.	0,65	0,38	0,77	0,74	-0,61	0,04	0,17	0,30	-0,75	-0,40	-0,87
EC							.	0,18	0,55	0,52	-0,02	0,40	0,84	0,74	-0,74	-0,43	-0,89
VC 98h								.	0,76	0,89	-0,76	0,83	-0,30	-0,28	-0,28	0,19	-0,28
H ⁺ 98h									.	0,92	-0,60	0,43	0,17	0,22	-0,59	-0,28	-0,72
AWCD 98h										.	-0,59	0,36	0,31	0,34	-0,57	-0,49	-0,73
Gluc											.	-0,11	0,51	0,45	0,26	-0,08	0,26
Fda												.	0,04	0,05	-0,48	0,37	-0,33
NA Gase													.	0,88	-0,28	-0,77	-0,52
Blase														.	-0,42	-0,76	-0,64
PuDO															.	0,09	0,30
RsDO																.	0,45
SmDO																	.

Tabella 8. Matrice delle correlazioni incrociate tra parametri misurati nei materiali organici. Il valore rappresenta il coefficiente di Pearson. I valori sottolineati mostrano $P < 0,05$ nell'analisi di regressione.

4. DISCUSSIONE

4. DISCUSSIONE

I materiali saggiati in questo studio sono stati scelti con l'obiettivo di rappresentare le diverse tipologie di torba e compost che vengono correntemente prodotti e commercializzati dall'industria italiana. Una particolare attenzione è stata rivolta ai compost generati a partire da rifiuti solidi urbani. Nel presente lavoro, infatti sono stati inseriti due ammendanti, *b* e *c*, che originano dalla frazione organica dei rifiuti solidi urbani (forsu), proveniente, rispettivamente, dalla raccolta differenziata e da un processo di selezione meccanica a partire dalla massa indifferenziata. Il compostaggio per questo tipo di materiale può considerarsi una valida via di smaltimento a basso impatto con conseguente valorizzazione delle risorse.

Il presente studio fornisce un ulteriore contributo alle conoscenze, già finora acquisite, in merito all'utilizzo di sostanza organica quale mezzo di lotta ai patogeni e riduzione dell'impatto ambientale nelle produzioni agrarie.

La fitotossicità rappresenta un parametro fondamentale per determinare l'attitudine dei materiali ad essere introdotti nel ciclo produttivo vegetale. Tra gli ammendanti organici utilizzati nel presente lavoro, solo i compost hanno mostrato fitotossicità, mentre le torbe hanno effetto di induzione sulla radicazione delle piante. Tale risultato è in accordo con

quanto è emerso da un'analisi condotta su numerosi casi studio che ha evidenziato la presenza di fitotossicità tra tipi diversi di sostanza organica, ma non nelle torbe (Bonanomi *et al.*, 2007). Gli estratti dei compost sono risultati fitotossici in relazione alla loro concentrazione. I compost realizzati a partire da rifiuti solidi urbani e da deiezioni zootecniche hanno mostrato maggiori livelli di inibizione della crescita radicale. La fitotossicità rilevata nel biosaggio del *Lepidium*, non si è manifestata, però, negli esperimenti in vaso per la valutazione dell'incidenza della malattia. L'estrema sensibilità del sistema utilizzato ha rilevato un effetto, poi mascherato probabilmente dalla "diluizione" con torba negli esperimenti in vaso. I compost, tra gli ammendanti organici, possiedono un livello intermedio di fitotossicità, avendola in parte persa con la parziale decomposizione (Zucconi *et al.*, 1981). In studi precedenti, è stato visto, che tali materiali possono essere usati fino ad una concentrazione pari al 50% vol./vol. senza produrre fitotossicità (Bonanomi *et al.*, 2007). I compost possono apportare molecole fitotossiche come metalli pesanti (Tam & Tiquia, 1994), composti fenolici (Wong, 1985), etilene ed ammoniaca (Wong *et al.*, 1983; Tam & Tiquia, 1994), sali (Tam & Tiquia, 1994) o acidi organici (Manios *et al.*, 1989). In lavori precedenti, la fitotossicità dei compost è stata associata al grado di decomposizione, al livello di ossigenazione del materiale durante il processo

di compostaggio (Morel *et al.*, 1985; van der Gaag *et al.*, 2007; Bonanomi *et al.*, 2006a) ed alla sua concentrazione salina (Hoitink & Fahy, 1986). Compost realizzati dal trattamento della frazione organica dei rifiuti urbani hanno un'alta concentrazione in sali che ne limita l'applicazione in substrati di coltivazione (Veeken *et al.*, 2005). Compost fatti con residui colturali, invece, in virtù del minore contenuto di sale, possono essere considerati dei substrati appropriati per integrare le torbe nei substrati di coltivazione (van der Gaag *et al.*, 2007). Nei nostri esperimenti i compost risultati più fitotossici presentano valori più elevati di EC. La fitotossicità dei compost è un problema abbastanza diffuso. In uno studio precedente, è stato proposto di utilizzare sfruttare le proprietà allelopatiche degli estratti di compost, realizzati da scarti dell'industria olearia, come bioerbicidi nei riguardi di quattro specie altamente invasive di infestanti, *Amaranthus retroflexus*, *Solanum nigrum*, *Chenopodium album* and *Sorghum halepense* (Cayuela *et al.* 2008).

I compost sono stati saggiati quali ammendanti di substrati di coltivazione in vaso (torba “scura”), onde determinare la loro efficacia nel sostenere la crescita delle piante e nel contenere l'incidenza del damping-off causato da patogeni tellurici. Inoltre, la torba “scura”, usata nei vasi di

controllo non ammendati, è stata confrontata con una torba “bionda”, per i livelli di malattia (%DO).

I saggi sono stati condotti su tre patosistemi (*P. ultimum*, *R. solani* e *S. minor* Vs *L. sativum*) al fine di ottenere informazioni più complete. Nella maggior parte degli studi sul conferimento di soppressività da parte di compost, i saggi impiegati per descrivere il fenomeno prevedevano un singolo patogeno (Bonanomi *et al.*, 2007), mentre, in realtà una pianta ospite, durante il suo ciclo di sviluppo, è suscettibile all’attacco di più agenti causali di malattie.

L’ammendamento della torba “scura” con tutti e cinque compost ha fatto registrare, una minore incidenza totale del damping-off sia per i patogeni inoculati. I compost sono spesso riportati come ammendanti capaci di migliorare le performance fitosanitarie dei substrati a base di torba, ai quali vengono aggiunti (Termorshuizen *et al.*, 2007; Veeken *et al.*, 2005; van der Gaag *et al.*, 2007; Scheuerell *et al.*, 2005; Diab *et al.*, 2003).

La dose di inoculo rappresenta un fattore importante e da tener bene in considerazione negli esperimenti per determinare la capacità soppressiva di un substrato. Di solito, la soppressività dei compost e di altre sostanze organiche, viene erroneamente studiata mediante l’impiego di concentrazioni elevate del patogeno, non coerenti con le situazioni reali in cui le malattie si

sviluppano ad una densità di inoculo piuttosto bassa (Termoshuizen *et al.*, 2007). Per questo motivo, i nostri biosaggi sono stati ripetuti per tre diverse concentrazioni di inoculo del patogeno. Al crescere della dose del fungo, è stato registrato un aumento dell'incidenza della malattia e contemporaneamente, una diminuzione della sensibilità del metodo. Infatti, le differenze di contenimento della malattia da parte dei materiali utilizzati, più marcate alla dose di inoculo più bassa, si riducono sensibilmente a quella più alta.

I materiali apparsi più promettenti nel controllo degli agenti di malattie telluriche usati nei nostri esperimenti, sono stati, nell'ordine, il compost *d* (da deiezioni zootecniche), il compost *b* (da frazione umida della raccolta differenziata), il compost *a* (da scarti vegetali industriali) ed il compost *e* (ammendante torboso compostato misto). L'efficacia dei compost varia a seconda del patosistema preso in considerazione e questo è coerente con i risultati di lavori precedenti (Veeken *et al.*, 2005). Anche i risultati del biosaggio sono andati in questa direzione. I compost *a* ed *e*, infatti, hanno fatto registrare più bassi livelli di incidenza della malattia quando usati, rispettivamente, nelle prove con *S. minor* e *P. ultimum*, mentre il compost *b*, ha funzionato meglio degli altri sia con *P. ultimum* che con *R. solani*. L'ammendamento con il compost *d*, a differenza dei casi appena descritti, ha

conferito multisoppressività, cioè il controllo della malattia causata da tutti i tre funghi fitopatogeni.

Alcuni autori (Scheuerell *et al.*, 2005; Bonanomi *et al.*, 2007) ritengono che solo livelli di incidenza della malattia inferiore al 20%, sono da considerarsi accettabili da parte degli agricoltori. Nei nostri esperimenti, contenimenti della malattia di questa entità sono stati registrati alle dosi di inoculo più basse. Per la dose di inoculo più alta, solo il compost *d*, quando usato nelle prove contro *R. solani*, soddisfa questo criterio.

Il compost *d* oltre a contenere lo sviluppo patogenetico dei tre funghi, nelle prove in vitro, ne ha inibito anche lo sviluppo saprofitario. Gli estratti del compost *d*, infatti, sia tal quali che sterili, hanno determinato una forte inibizione dello sviluppo miceliare radiale dei tre funghi, mentre gli altri materiali hanno influenzato in maniera diversa la fase saprofitaria dei miceti. Gli esperimenti in vaso hanno fatto rilevare un effetto positivo della sterilizzazione sulla severità della malattia. L'ammendamento della torba "scura" con i compost sterilizzati ha fatto registrare un aumento dell'incidenza totale del damping-off per i tre patogeni inoculati. Lo sviluppo saprofitario è stato influenzato dalla presenza della componente biotica negli estratti, principalmente per *P. ultimum*. *R. solani* è stata condizionata in misura minore, mentre, *S. minor* ha mostrato difficoltà di crescita su tutti gli

estratti dei compost. Risultati diversi sono stati ottenuti per le torbe: i tre funghi hanno mostrato un buono sviluppo saprofitario sui loro estratti acquosi.

La soppressività imputabile ai fattori biologici, definita anche come soppressività biologica del suolo (attività soppressiva della componente biotica residente), risulta chiara ed evidente quando l'incidenza della malattia è nettamente inferiore a quella rilevata negli stessi substrati sottoposti a trattamenti fisici del calore (Chen *et al.*, 1987; Kuter *et al.*, 1998; Nakasaki *et al.*, 1998; van Os & van Ginkel, 2001).

La sterilizzazione degli ammendanti, determinando l'annullamento della loro componente biotica, ha sortito un aumento dell'incidenza della malattia. La sterilizzazione consente di evidenziare il ruolo nel determinismo della soppressività giocato dalle comunità microbiche residenti (Chen *et al.*, 1987; Kuter *et al.*, 1988; Nakasaki *et al.*, 1998; van Os & van Ginkel, 2001). Le ipotesi sui meccanismi attraverso i quali gli ammendanti organici possono determinare il contenimento delle malattie telluriche partono da considerazioni di carattere biologico. La sostanza organica di nuova introduzione incide sull'equilibrio microbico da un lato aumentando l'attività di microbi antagonisti (Hoitink & Boehm, 1999), dall'altro facendo

incrementare la competizione per le risorse a discapito dei patogeni (Lockwood, 1990).

In studi precedenti è stato riscontrato un effetto sterilizzazione simile a quello emerso dai nostri esperimenti. Il trattamento in autoclave di mix soppressive di compost+sabbia, ha determinato una riduzione delle popolazioni di batteri, funghi ed attinomiceti, ed ha comportato l'eliminazione della soppressione del damping-off causato da *P. graminicola* su *Agrostis palustris* (Craft & Nelson, 1996). La sterilizzazione con il calore ha avuto per conseguenza la distruzione delle capacità soppressive di compost e di torbe “scure” e “bionde” saggiate contro *Rhizoctonia* e *Pythium* spp. (Krause *et al.*, 2001). Nei casi in cui un ammendante organico viene addizionato ad un substrato già caratterizzato da una propria comunità, la nuova disponibilità nutrizionale comporta stravolgimenti degli equilibri predeterminati a vantaggio dei forti competitori saprofitari ed a discapito di quelli più deboli, come i patogeni. Serra-Wittling *et al.*, (1996) ha rilevato che l'aggiunta di compost ad un suolo naturale si traduceva in un aumento di risorse per la comunità microbica, e comportava un aumento della competizione a svantaggio dei patogeni. L'ammendamento del suolo con compost induceva soppressività, sia che questo fosse usato tal quale, sia che fosse usato previa sterilizzazione. Invece, se il suolo veniva sterilizzato,

l'ammendamento organico non determinava modifiche della conducività iniziale. Inoltre, l'apporto di compost determinava un aumento considerevole delle popolazioni microbiche del suolo naturale.

Nei nostri esperimenti, il compost è stato ammendato ad una torba precedentemente sterilizzata. La maggiore soppressività mostrata dalle mix con compost tal quale, rispetto a quelle in cui è stato aggiunto compost sterilizzato, è dovuta essenzialmente all'apporto della microflora residente, ed al risultato dell'interazione di questa con la pianta ed il patogeno. La composizione specifica della comunità microbica presente nel compost è il risultato del processo di compostaggio (vedi Introduzione). La colonizzazione del compost da parte di agenti di biocontrollo, o microrganismi benefici, avviene principalmente nella fase di maturazione del processo, durante la quale la disponibilità di fonti energetiche per la microflora diviene un fattore limitante. La disponibilità delle risorse energetiche presenti negli ammendanti organici, costituite essenzialmente da fonti di carbonio, influenza aspetti fondamentali del determinismo della soppressività, come la composizione specifica della comunità microbica residente, e successivamente l'interazione di questa con il patogeno. Il compost rappresenta una fonte nutrizionale per la microflora residente,

oppure introduce agenti di biocontrollo che sostengono la soppressività (Hoitink & Boehm, 1999).

Per meglio comprendere come la trasformazione della sostanza organica durante il processo di decomposizione influenza la crescita delle piante in presenza del patogeno, è stata applicata, in passato, la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) (Boehm *et al.*, 1997; Chen & Inbar, 1993; Inbar *et al.*, 1989; Inbar *et al.*, 1993; Stone *et al.*, 2001). Nel presente lavoro, in linea con altri studi simili (Chen *et al.*, 2003; Boehm *et al.*, 1997) tale tecnica è stata usata per ottenere informazioni in merito alla distribuzione del carbonio organico, tra le diverse classi di molecole, nella composizione dei materiali organici. Questo approccio è stato seguito per rilevare la capacità potenziale della sostanza organica di supportare l'attività microbica e determinare, quindi, la soppressività generale delle malattie telluriche (Chen & Inbar, 1993; Inbar *et al.*, 1989).

I risultati della spettroscopia ^{13}C CPMAS NMR dimostrano che la concentrazione dei carboni O-alchilici gioca un ruolo importante nel determinismo della capacità soppressiva dei materiali organici saggiati, solo in presenza della loro comunità microbica intatta. Solo in tal caso, infatti, i polisaccaridi possono essere utilizzati dagli organismi competitori che inducono soppressività, in caso contrario questi nutrienti rimangono a

disposizione del patogeno. È stato osservata, infatti, una correlazione negativa tra la concentrazione in polisaccaridi e l'incidenza percentuale del damping-off causata dai tre patogeni, negli esperimenti eseguiti sui materiali tal quali. Tale correlazione, invece, è nulla negli esperimenti realizzati previa sterilizzazione.

Tale risultato è in linea con quanto già osservato in ricerche precedenti. La spettroscopia ^{13}C CPMAS NMR, usata per analizzare la distribuzione del carbonio organico in torbe saggiate contro *Pythium* spp., ha permesso di correlare positivamente la dinamica della soppressività con il loro contenuto in carboidrati (Boehm *et al.*, 1997; Hoitink & Boehm, 1999), e più in generale con il contenuto di substrati “energetici” (lignina e cellulosa) prontamente disponibili per i microrganismi (Stone *et al.*, 2001; Chen, 2003). In altri studi, inoltre, è stato riscontrato che la presenza di sostanze cellulosiche nei compost sostengono il controllo delle malattie per un tempo più lungo rispetto alla loro applicazione (Stone *et al.*, 2004).

I microrganismi edafici, stimolati dalle fonti energetiche, danno un forte contributo all'attività soppressiva degli ammendanti in cui sono insediati, attraverso quattro meccanismi principali: competizione, antibiosi, parassitismo ed induzione di resistenza (Lockwood, 1988). La concentrazione e la disponibilità di nutrienti (p.es. carboidrati) all'interno

della sostanza organica, giocano un ruolo fondamentale nella regolazione delle citate attività (Baker & Cook, 1974; Chen *et al.*, 1998; Hoitink *et al.*, 1997). Oltre, dunque, alla presenza di nutrienti, un fattore importante è costituito dalla loro disponibilità affinché siano prontamente assimilati dai microrganismi. I composti nutritivi, infatti, pur presenti in un ammendante organico, possono essere indisponibili alla degradazione microbica, perché protetti da barriere chimico-fisiche, che ostacolano le possibilità di contatto con i microrganismi nella soluzione circolante. Le sostanze umiche possono avere un ruolo importante in questo frangente, ma nel presente lavoro non sono state trovate correlazioni tra damping-off e indici di umificazione. Le barriere chimico-fisiche possono essere costituite da gruppi idrofobici all'interno dei quali le frazioni labili del carbonio organico sono intrappolate. A questo proposito è stato valutato l'effetto dell'indice di idrofobicità sulla severità della malattia. Analogamente a quanto accade per i polisaccaridi, anche tale indice correla con il damping-off solo nei biosaggi in cui è stato usato materiale organico, non preventivamente sterilizzato, ma questa volta positivamente. Le molecole idrofobiche, evidentemente, riducono la disponibilità di nutrienti per i microrganismi, bloccando, difatti gli effetti positivi della loro presenza ai fini della soppressività. L'indice di idrofobicità è stato descritto quale misura della maturità di un compost (Baldock *et al.*,

1997; Spaccini *et al.*, 2008). È stato riportato che gli spettri NMR del carbonio organico, eseguiti su campioni di un materiale sottoposto a compostaggio, mostrano una diminuzione nel contenuto di carboidrati (C idrofilici) durante il processo, mentre i livelli dei carboni alchilici ed aromatici, che rappresentano la frazione idrofobica, aumentano (Inbar *et al.*, 1991b; 1989; 1993b). Il declino della concentrazione in carboidrati provoca il turnover di microrganismi benefici con altri saprofiti, determinando una perdita di soppressività del compost (Hoitink *et al.*, 1993). I risultati del presente studio assieme a queste ultime osservazioni, dimostrano che l'indice di idrofobicità può essere utilizzato quale parametro di caratterizzazione delle potenzialità soppressive di un compost.

La struttura della comunità microbica propria di ciascun materiale saggiato in questo studio, è stata determinata dai fattori e dai processi di produzione utilizzati. Il Biolog™ ha fatto rilevare come l'impronta metabolica delle comunità, e quindi la loro capacità di utilizzazione di diverse fonti di carbonio, fosse correlata alle risorse nutrizionali presenti nella matrice da cui hanno avuto origine i materiali organici saggiati (Hitzl *et al.*, 1997). Nei materiali organici di origine vegetale, con alto tenore in carbonio organico totale, il contenuto in azoto rappresenta un fattore

limitante lo sviluppo microbico durante il processo di compostaggio, influenzando la struttura della comunità microbica finale.

Nei nostri esperimenti è stata osservata una correlazione positiva tra i livelli di AWCD delle comunità microbiche dei materiali saggiati ed il tenore in N totale e proteine totali. La stessa correlazione è stata ritrovata anche con il tenore in C carbossilico ed N-alchilico, che rappresenta il carbonio organico contenuto in molecole azotate. Tale forma di carbonio è correlata a sua volta con l'N e le proteine totali. Tali risultati suggeriscono che comunità microbiche residenti in substrati con più alta disponibilità di azoto presentano livelli più elevati di attività metabolica e diversità funzionale.

Gli indici AWCD, H' e VC, derivanti dall'elaborazione dei risultati del Biolog™, hanno mostrato una correlazione negativa con i livelli di incidenza delle malattie causate da *P. ultimum*, *R. solani* e *S. minor*. L'AWCD, che riflette la capacità ossidativa dei microrganismi contenuti nei materiali sviluppata nel Biolog, può essere usata come indicatore dell'attività microbica (Gomez *et al.*, 2006). Una comunità microbica che mostra elevati livelli di attività metabolica e diversità funzionale è nelle condizioni migliori per determinare alta pressione competitiva per le risorse nutrizionali e quindi indurre fungistasi. Il compost *d*, risultato essere il più promettente ai fini di una sua applicazione nella lotta alle malattie telluriche, presenta il più alto

tenore in azoto, nelle tre forme rilevate (N totale, N ammoniacale ed N organico). Le risorse azotate facilmente assimilabili vengono utilizzate rapidamente dalla microflora residente, a discapito dei patogeni. La competizione per queste risorse può essere alla base della soppressività registrata nel presente studio, correlata al contenuto in azoto totale ed organico. La competizione tra le popolazioni microbiche per l'assunzione di carbonio ed azoto è stata proposta quale meccanismo principale della soppressività (Boehm *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1995; Mandelbaum & Hadar, 1990). Le forme di azoto ammoniacale risultando, invece, tossiche per i funghi potrebbero essere coinvolte, insieme al fenomeno dell'N-starvation nelle determinate condizioni di fungistasi. Tenuta & Lazarovits (2002) hanno riportato che alti livelli di ammoniaca in un substrato determinano una diminuzione della sopravvivenza di propagali di *Verticillium dahliae*.

Anche le attività enzimatiche saggiate, che sono collegate alla presenza ed all'azione della microflora residente negli ammendanti organici, correlano negativamente con i livelli di incidenza della malattia. L'attività enzimatica totale, non specifica, di un substrato di coltivazione può essere caratterizzata attraverso la misura dei livelli di idrolisi della fluoresceina di acetato (Garcia-Gómez *et al.*, 2003). Spesso tale attività è stata correlata alla

soppressione delle malattie causate da patogeni tellurici fungini come *Pythium* spp. (Chen *et al.*, 1988b; Chen *et al.*, 1988a), e altri miceti appartenenti a specie diverse (Hoitink & Boehm, 1999; Inbar *et al.*, 1991a). Comunque, l'efficacia di questo parametro è controversa, dal momento che trend diversi sono stati ritrovati a seconda del grado di decomposizione del materiale organico usato (Cayuela *et al.*, 2008). In questo studio i livelli più alti di FDA sono stati ritrovati per il compost *e*, il quale è risultato essere il più soppressivo nei riguardi di *P. ultimum*. La soppressione del damping-off causata da questo patogeno è stata spesso associata a meccanismi di soppressività generale e, all'aumento dell'attività di idrolisi della fluoresceina di acetato (Boehm *et al.*, 1997). Comunque tale attività enzimatica non risulta essere correlata con i livelli di popolazione microbica determinati per i materiali saggati. Tale situazione può essere dovuta al fatto che i metodi classici di conta microbica escludono una grossa fetta della microflora presente nei campioni, avendo come target solo gli organismi coltivabili.

Gli enzimi idrolitici, legati all'antagonismo, possono avere un ruolo importante nelle interazioni che si sviluppano tra i patogeni vegetali tellurici e le piante (Jung *et al.*, 2003). La produzione di enzimi idrolitici da parte della microflora, è stata proposta quale meccanismo di soppressività (Roberts

& Lumsden, 1988). Sebbene gli enzimi chitinolitici non abbiano azione diretta su *P. ultimum*, i loro livelli di attività correlano negativamente anche con l'incidenza del *Pythium* damping-off. L'attività enzimatica specifica, come in questo caso, può rappresentare un indicatore indiretto dell'attività generale della microflora a cui spesso è stata attribuita la soppressività verso malattie causate dall'oomicete. Alcuni autori, infatti, hanno riportato che i livelli dell'attività enzimatica specifica osservati durante il processo di compostaggio, sono correlati a quelli dell'attività microbica ed ai livelli dei nutrienti prontamente disponibili (García *et al.*, 1993; Benitez *et al.*, 1999).

Per gli altri due patogeni, invece, l'attività idrolitica può assumere un ruolo più diretto e specifico. Il compost *d*, che ha mostrato multisoppressività ed il soddisfacimento del criterio descritto da Scheuerell *et al.*, (2005), relativo ad un contenimento della malattia causata da *R. solani* superiore all'80%, ha fatto registrare i più alti livelli di attività enzimatica specifica, chitinolitica in particolare. In studi precedenti, è stato suggerito che l'attività chitinasica può avere un ruolo importante nella soppressività degli ammendanti organici, causando la lisi delle pareti cellulari fungine mediante idrolisi della chitina ivi contenuta (Boulter *et al.*, 2000; Labrie *et al.*, 2001).

Il nostro risultato è in linea con quanto descritto da Yulianti *et al.*, (2006), il quale ha riportato che la soppressione, da parte di compost, del

damping-off su piante di pomodoro causato da *R. solani* è associata all'azione singola o sinergica di enzimi idrolitici che causano la lisi delle ife fungine (Jung *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1999).

5. CONCLUSIONI

5. CONCLUSIONI

Nel presente lavoro sono stati condotti studi, con modelli semplici e complessi, per saggiare l'attività soppressiva di materiali organici contro patogeni tellurici. L'interazione tra sostanza organica, pianta e patogeno è stata studiata mediante biosaggi sia in vitro che in vivo. Lo studio dei meccanismi che hanno determinato la capacità soppressiva dei materiali è stato sviluppato attraverso la misura di parametri chimico-fisici, la determinazione della distribuzione del carbonio organico a mezzo NMR, la determinazione dell'attività microbica (metabolica ed enzimatica). Dalle ricerche svolte sono emerse le potenzialità di questi materiali per un eventuale loro impiego in agricoltura. I risultati ottenuti indicano che la capacità di sopprimere le malattie dipende dalla composizione chimica e dall'attività metabolica della componente biotica.

In particolare, tale ricerca ha consentito di giungere alle seguenti conclusioni:

- i compost mostrano migliori performances contro i patogeni, rispetto alle torbe;

-
- i materiali più promettenti nel controllo delle malattie telluriche sono: “Compost da deiezioni zootecniche”, “Compost da Umido”, “Compost da Vinacce” e “Ammendante Torboso Compostato Misto”;
 - i Compost “da deiezioni zootecniche” e “da Umido” mostrano multisoppressività;
 - gli estratti di questi compost inibiscono lo sviluppo miceliare dei funghi testati. Le loro comunità microbiche mostrano livelli elevati di attività metabolica ed enzimatica;
 - la comunità microbica presente negli ammendanti organici determina una riduzione dell’incidenza delle malattie telluriche in funzione delle sue caratteristiche fisiologiche e metaboliche, e della diversità funzionale;
 - la natura chimica del carbonio organico presente nell’ammendante e la sua disponibilità, influenza l’incidenza del damping-off;
 - le attività enzimatiche N-acetilglucosamminidasica e chitobiosidasica della microflora edafica ed il contenuto di azoto correla negativamente con la severità del damping-off da *R. solani* e *S. minor*;
 - la capacità di sopprimere le malattie è il risultato dell’interazione tra la composizione chimica e funzionalità della componente biotica.

6. REFERENZE CITATE

6. REFERENZE CITATE

Abawi G.S., Widmer T.L., 2000. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Applied Soil Ecology* **15**:37-47.

Akhtar M., Malik A., 2000. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes-a review. *Bioresource Technology* **24**: 35-47.

Arnold Bik R., Boertje G.A., 1975. Fertilising standards for potting composts based on the 1:1.5 volume extraction method of soil testing. *Acta Horticulturae* **50**: 153–156.

Asirifi K.N., Wendy C., Parbery D.G., 1994. Suppression of *Sclerotinia* soft rot of lettuce with organic soil amendments. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **34**: 131–136.

Atalla R.H., VanderHart D.L., 1999. The role of solid state ^{13}C NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **15**: 1–19.

Bailey K.L., Lazarovits G., 2003. Suppressing soil-borne diseases with residues management and organic amendments. *Soil & Tillage Research* **72**: 169-180.

Baker K.F., Cook R.J., 1974. Biological Control of Plant Pathogens. Freeman, San Francisco, CA, USA.

Baldock J.B., Oades J.M., Nelson P.N., Skene T.M., Golchin A., Clarke P., 1997. Assessing the extent of decomposition of natural organic materials using solid-state ^{13}C -NMR spettroscopy. *Australian Journal of Soil Research* **35**:1061-1083.

Benitez E., Nogales R., Elvira C., Marciandaro G., Ceccanti B., 1999. Enzyme activities as indicators of the stabilization of sewage sludge composting with *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology* **67**: 297–303.

Blok W.J., Lamers J.G., Termoshuizen A.J., Bollen G.J., 2000. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology* **90**: 253-259.

Boehm M.J., Madden L.V., Hoitink H.A.J., 1993. Effect of organic matter decomposition level on bacterial species diversity and composition in relationship to Pythium damping-off severity. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 4171-4179.

Boehm M.J., Wu T., Stone A.G., Kraakman B., Iannotti D.A., 1997. Cross-polarized magic-angle spinning ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization of soil organic matter relative to culturable bacterial species composition and sustained biological control of Pythium root rot. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 162-168.

Bonanomi G., Antignani V., Pane C., Scala F., 2007. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *Journal of Plant Pathology* **89**: 311-324.

Bonanomi G., Chiurazzi M., Caporaso S., Del Sorbo G., Moschetti G., Scala F., 2008. Soil solarization with biodegradable materials and its impact on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 1989-1998.

Bonanomi G., Giorgi V., Del Sorbo G., Neri D., Scala F., 2006a. Olive mill residues affect saprophytic growth and disease incidence of foliar and soilborne plant fungal pathogens. *Agriculture Ecosystem and Environment* **115**: 194-200.

Bonanomi G., Sicurezza M.G., Caporaso S., Assunta E., Mazzoleni S., 2006b. Phytotoxicity dynamics of decaying plant materials. *New Phytologist* **169**: 571-578.

Boulter J.I., Boland G.J., Trevors J.T., 2000. Compost: a study of the development process and end-product potential for suppression of turfgrass disease. *World Journal Microbiology Biotechnology* **16**: 115–134.

Boulter J.I., Boland G.J., Trevors J.T., 2002. Evaluation of composts for suppression of dollar spot (*Sclerotinia homoeocarpa*) of turfgrass. *Plant Disease* **86**: 405-410.

Brown M.W., Tworkoski T., 2004. Pest management benefits of compost mulch in apple orchards. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **103**: 465-472.

Cayuela M.L., Millner P.D., Meyer S.L.F., Roig A., 2008. Potential of olive mill waste and compost as biobased pesticides against weeds, fungi, and nematodes. *Science of the Total Environment* doi:10.1016/j.scitotenv.2008.03.031

Celi L., Schnitzer M., Nègre M., 1997. Analysis of carboxyl groups in soil humic acids by a wet-chemical method, fourier-transform infrared spectrophotometry, and solution-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. A comparative study. *Soil Science* **162**: 189–197

Chen W., Hoitink H.A.J., Madden L.V., 1988a. Microbial activity and biomass in container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* **78**:1447-1450.

Chen W., Hoitink H.A.J., Schmitthenner A.F., Tuovinen O.H., 1988b. The role of microbial activity in suppression of damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* **78**: 314-322.

Chen W., Hoitink H.A.J., Schmitthenner A.F., 1987. Factors affecting suppression of *Pythium* damping-off in container media amended with composts. *Phytopathology* **77**: 755-760.

Chen Y., 2003. Nuclear magnetic resonance, infrared and pyrolysis studies of solid organic waste composts. *Compost Science and Utilisation* **11**: 152-168.

Chen Y., Inbar Y., 1993. Chemical and spectroscopical analyses of organic matter transformations during composting in relation to compost maturity.

Chung Y.R., Hoitink H.A.J., Dick W.D., Herr L.J., 1988a. Effects of organic matter decomposition level and cellulose amendment on the inoculum potential of *Rhizoctonia solani* in hardwood bark media. *Phytopathology* **78**: 836-840.

Chung Y.R., Hoitink H.A.J., Lipps P.E., 1988b. Interactions between organic matter decomposition level and soilborne disease severity. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **24**: 183-193.

Conklin A.E., Erich M.S., Liebman M., Lambert D., Gallandt E.R., Halteman W.A., 2002. Effects of red clover (*Trifolium pratense*) green manure and compost soil amendments on wild mustard (*Brassica kaber*) growth and incidence of disease. *Plant and Soil* **238**: 245-256.

Cook, R. J. & Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens.*, APS Press, St. Paul.

Coventry E., Noble R., Mead A., Whipps J.M., 2005. Suppression of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) in different soils using vegetable wastes. *European Journal of Plant Pathology* **111**: 101-112.

Craft M., Nelson E.B., 1996. Microbial properties of composts that suppress damping-off and root rot of creeping Bentgrass caused by *Pythium graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1550-1557.

Croteau G.A., Zibilske L.M., 1998. Influence of papermill processing residuals on saprophytic growth and disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology* **10**: 103-115.

Davey C.B., Papavizas G.C., 1963. Saprophytic activity of *Rhizoctonia* as affected by the carbon-nitrogen balance of certain organic soil amendments. *Soil Science Society America Proceeding* **27**: 164-167.

De Bertoldi M., Vallini G., Pera A., 1983. Biology of composting: A review. *Waste Management & Research* **1**: 157-176.

De Bertoldi M., Vallini G., Pera A., 1985. Technological aspects of composting including modelling and microbiology. In : *Composting of Agricultural and Other Wastes* (J.K.R. Gasser ed.), pp 27-40, Elsevier Applied Science Publishers, London-New York.

De Brito A., Gagne S., Antoun H., 1995. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 194-199.

Diab H., Hu S., Benson D.M., 2003. Suppression of *Rhizoctonia solani* on impatiens by enhanced microbial activity in composted swine waste amended potting mixes. *Phytopathology* **93**: 1115-1123.

El-Masry M.H., Khalil A.I., Hassouna M.S., Ibrahim H.A.H., 2002. *In situ* and *in vitro* suppressive effect of agricultural composts and their water extracts on some phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**: 551–558.

Erhart E., Burian K., Hartl W., Stich K., 1999. Suppression of *Pythium ultimum* by biowaste composts in relation to compost microbial biomass, activity and content of phenolic compounds. *Journal of Phytopathology* **147**: 299-305.

Ferrara A.M., Avataneo M., Nappi P., 1996. first experiments of compost suppressiveness to some phytopathogens. In *The Science of Composting* ed. de Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B., Papi T., pp. 1157-1160. London: Blackie Academic & Professional.

Friberg H., Lagerlöf J., Rämert B., 2005. influence of soil fauna and fungal plant pathogens in agricultural and horticultural systems. *Biocontrol Science and Tecnology* **15**: 641-658.

Garcia C., Hernández T., Costa C., Ceccanti B., Masciandaro G., Ciardi C., 1993. A study of biochemical parameters of composted and fresh municipal wastes. *Bioresource Technology* **44**: 17–23.

Garcia-Gómez A., Roig A., Bernal M.P., 2003. Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource Technology* **86**: 59–64.

Genevini P., Adani F., Veecken A.H.M., Nierop K.G.J., Scaglia B., Dijkema C., 2002. Qualitative modifications of humic acid-like and core-humic acidlike during high-rate composting of pig faces amended with wheat straw. *Soil Science and Plant Nutrition* **48**: 143–50.

Gomez E., Ferreras L., Toresani S., 2006. Soil bacterial functional diversità as influenced by organic amendment application. *Bioresurce Technology* **97**: 1484-1489.

Gorodecki B., Hadar Y., 1990. Suppression of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* diseases in container media containg composted seperated cattle manure and composted grape marc. *Crop Protection* **9**: 271-274.

Grebus M.E., Watson M.E., Hoitink H.A.J., 1994. Biological, chemical and physical properties of composted yard trimmings as indicators of maturity and plant disease suppression. *Compost Science Utilization* **2**: 57-71.

Guckert J.B., Carr G.J., Johnson T.D., Hamm B.G., Davidson D.H., Kumagai Y., 1996. Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *Journal of Microbiological Methods* **27**: 183-197.

Hadar Y., Mandelbaum R., 1996. Suppression of *Pythium aphanidermatum* damping-off in container media containing composted liquorice roots. *Crop Protection* **5**: 88-92

Harch B.D., Correl R.L., Meech W., Kirkby C.A., Pankhurst C.E., 1997. Using the Gini coefficient with Biolog substrate utilization data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities. *Journal of Microbiological Methods* **30**: 91-101.

Hardy G.E.S.J., Sivasithamparam K., 1991. Suppression of *Phytophthora* Root Rot by a composted Eucalyptus Bark Mix. *Australian Journal of Botany* **39**: 153-159.

Harris K., Young I.M., Gilligan C.A., Otten W., Ritz K., 2003. Effect of bulk density on the spatial organisation of the fungus *Rhizoctonia solani* in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **44**:45-56.

Hitzl W., Rangger A., Sharma S., Insam H., 1997. Separation power of the 95 substrates of the Biolog GN plates determined in various soils. *FEMS Microbial Ecology* **22**: 167-174.

Hoitink H.A.J., Boehm M.J., 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* **37**: 427- 446.

Hoitink H.A.J., Boehm M.J., Hadar Y., 1993. Mechanism of suppression of soil borne plant pathogen in compost-amended substrates. In *Science and Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiological and Utilization Aspects* (Keener, H.A.J.H.A.H.M., ed.), pp. 601-621. Renaissance Publications, Worthington, Ohio.

Hoitink H.A.J., Fahy P.C., 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual Review Phytopathology* **24**: 93–114.

Hoitink H.A.J., Grebus M.E., 1994. Status of biological control of plant diseases with composts. *Compost Science Utilization* **2**: 6-12.

Hoitink H.A.J., Inbar Y., Boehm M.J., 1991. Status of compost-amended potting mixes naturally suppressive to soilborne diseases of floricultural crops. *Plant Disease* **75**: 869-873.

Hoitink H.A.J., Stone A.G., Grebus M.E., 1996a. Suppression of plant diseases by composts. In *The Science of Composting* (De Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B. & Papi T., eds.), Vol. 1, pp. 373-381. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Hoitink H.A.J., Stone A.G., Han D.Y., 1997. Suppression of plant diseases by composts. *HortScience* **32**: 184-187.

Hu S., Grünwald N.J., van Bruggen A.H.C., Gamble G.R., Drinkwater L.E., Shennan C., Demment M.W., 1997. Short-term effects of cover crop incorporation on soil carbon pools and nitrogen dynamics. *Soil Science Society of America Journal* **61**: 901-911.

Inbar Y., Boehm M.J., Hoitink H.A.J., 1991a. Hydrolysis of fluorescein diacetate in sphagnum peat container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Soil Biology and Biochemistry* **23**: 479-483.

Inbar Y., Chen Y., Hadar Y., 1991b. Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopy analysis of organic matter transformations during composting of solid wastes from wineries. *Soil Science* **152**: 272-282.

Inbar Y., Chen Y., Hoitink H.A.J., 1989. Solid state carbon-13 nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy of composted organic matter. *Soil Science Society of America Journal* **53**: 1695-1701.

Inbar Y., Hadar Y., Chen Y., 1992. Characterization of humic substances formed during the composting of solid wastes from wineries. *Science of the Total Environment* **113**:35-48.

Inbar Y., Hadar Y., Chen Y., 1993. Recycling of cattle manure: The composting process and characterization of maturity. *Journal of Environmental Quality* **22** : 857-863.

Insam H., Amor K., Renner M., Crepaz C., 1996. Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microbial Ecology* 31:77-87.

Janvier C., Villeneuve F., Alabouvette C., Edel-Hermann V., Mateille T., Steinberg C., 2007. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 1-23.

Jung, J.W., An, K.N., Jin, Y.L., Park, R.D., Lim, K.T., Kim, K.Y., Kim, T.H., 2003. Biological control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using chitinase-producing *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 1261–1264.

Katan J., 1996. Soil solarization: integrated control aspects. In: Hall, R. (Ed.), *Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens*. APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 250-278.

Kipp, J.A., Wever, G., de Kreijl, C., 2000. International substrate manual. In: Elsevier International Business Information, Doetinchem, The Netherlands.

Kirkegaard J.A., Sarwar M., Wong P.T.W., Mead A., Howe G., Newell M., 2000. field studies on the biofumigation of take-all by Brassica break crops. *Australian Journal of Agricultural Research* **51**: 445-456.

Knicker H, Skjemstad JO. 2000. Nature of organic carbon and nitrogen in physically protected organic matter of some Australian soils as revealed by solid-state ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy. *Australian Journal of Soil Research* **38**:113–27.

Knicker, H., Lüdemann, H.-D. 1995. N^{15} and C^{13} CPMAS and solution NMR studies of N^{15} enriched plant material during 600 days of microbial degradation. *Organic Geochemistry* **23**: 329-341.

Krause S.M., Madden L.V., Hoitink H.A.J., 2001. Effect of potting mix microbial carrying capacity on biological control of *Rhizoctonia* damping off of radish and *Rhizoctonia* crown and root rot of poinsettia. *Phytopathology* **91**: 1116-1123.

Kuter G.A., Hoitink H.A.J., Chen W., 1988. Effects of municipal sludge compost curing time on suppression of *Pythium* and *Phytophthora* diseases. *Plant Disease* **72**: 751-756.

Kuter G.A., Nelson E.B., Hoitink H.A.J., Madden L.V., 1983. Fungal populations in container media amended with composted hardwood bark suppressive and conducive to *Rhizoctonia* damping-off. *Phytopathology* **73**:1450-1456.

Kwok O.C.H., Fahy P.C., Hoitink H.A.J., Kuter G.A., 1987b. Intercations between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology* **77**: 1206-1212.

Kwok O.C.H., Hoitink H.A.J., Chen W., 1987a. Characterization of bacteria involved in suppression of *Pythium* damping off. *Phytopathology* **77**: 1707.

Labrie C., Leclerc P., Cote N., Roy S., Brzezinski R., Hogue R., Beaulieu C., 2001. Effect of chitin waste-based composts produced by two-phase composting on two oomycete plant pathogens. *Plant Soil* **235**: 27–34.

Lazarovits G., 2001. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. *Canadian Journal of Plant Pathology* **23**: 1-7.

Lazarovits G., Conn K.L., Potter J.W., 1999. Reduction of potato scab, *Verticillium* wilt, and nematodes by soymeal and meat and bone meal in two Ontario potato fields. *Canadian Journal of Plant Pathology* **21**: 345-353.

Lewis J.A., Lumsden R.D., Millner P.D., Keinath A.P., 1992. Suppression of damping-off of peas and cotton in the field with composted sewage sludge. *Crop Protection* **11**: 260-266.

Lewis J.A., Papavizas G.C., 1977. Effect of plant residues on chlamydospore germination of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* and on *Fusarium* root rot of beans. *Phytopathology* **67**: 925-929.

Litterick A.M., Harrier L., Wallace P., Watson C.A., Wood M., 2004. The role of uncomposted materials, composts, manures, and compost extracts in reducing pest and disease incidence and severity in sustainable temperate agricultural and horticultural crop production: A review. *Critical Reviews in Plant Sciences* **23**: 453-479.

Liu W., Marsh T., Cheng H., Forney L.J., 1995. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Applied Environmental and Microbiology* **63**: 4516-4522.

Lockwood J.L., 1988. Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 93-121.

Lockwood J.L., 1990. Relation of energy stress to behaviour of soilborne plant pathogens and to disease development. In: Hornby D. (ed.), *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens*, pp. 197-214. CAB International, Wallingford, UK.

Lorito M., 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. in: *Trichoderma & Gliocladium*, Kubicek C.P. and Harman G.E. (Eds.), Taylor & Francis, London, UK, Vol. 2: 73-99.

Lumsden R.D., Lewis J.A., and Papavizas G.C., 1983b. Effect of organic amendments on soilborne plant diseases and pathogen antagonists, in:

Environmentally Sound Agriculture, W. Lockeretz, ed. Praeger Press, New York. pp. 51-70.

Lumsden R.D., Lewis J.A., Millner P.D., 1982. Composted sludge as a soil amendment for control of soilborne plant diseases. Pages 275-277 in: Research for Small farms. P.W. Kerr, Jr., and L. Knutson, eds. U.S. Dep. Agric. Res. Serv. Misc. Publ. 1422, U.S. Government Printing Office, Washington, DC.

Lumsden R.D., Lewis J.A., Millner P.D., 1983a. Effect of composted sewage sludge on several soilborne pathogens and diseases. *Phytopathology* **73**:1543-1548.

Lumsden R.D., Millner P.D, Lewis J.A., 1986. Suppression of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* with composted sewage sludge. *Plant Disease* **70**: 197-201.

Magid J., Henriksen O., Thorup-Kristensen K., Mueller T., 2001. Disproportionately high N-mineralisation rates from green manures at low temperatures – implications for modelling and management in cool temperate agro-ecosystems. *Plant and Soil* **228**: 73-82.

Maie N., Watanabe A., Hayamizu K., Kimura M., 2002. Comparison of chemical characteristics of Type A humic acids extracted from subsoils of paddy fields and surface ando soils. *Geoderma* **106**:1–19.

Mandelbaum R., Hadar Y., 1990. Effects of available carbon source on microbial activity and suppression of *Pythium aphanidermatum* in compost and peat container media. *Phytopathology* **80**: 794-804.

Mandelbaum R., Hadar Y., Chen Y., 1988. Composting of agricultural wastes for their use as container media: Effect of heat treatments on suppression of *Pythium aphanidermatum* and microbial activities in substrates containing compost. *Biological Wastes* **26**:261-274.

Manici L.M., Caputo F., Babini V., 2004. Effect of green manure on *Pythium* spp. population and microbial communities in intensive cropping systems. *Plant and Soil* **263**: 133- 142.

Manios V.I., Tsikalas P.E., Siminis H.I., 1989. Phytotoxicity of olive tree in relation to organic acid concentration. *Biological Wastes* **27**: 307-317.

Martin F.N., 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology* **41**: 325-350.

Mazzola M., 2004. Assessment and management of soil microbial community for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 35-59.

Mazzola M., Granatstein D.M., Elfving D.C., Mullinix K., 2001. Suppression of specific apple root pathogens by *Brassica napus* seed meal

amendment regardless of glucosinolate content. *Phytopathology* **91**: 673-679.

McDonald B.A., Linde C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349-379.

McKellar M.E., Nelson E.B., 2003. Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid metabolizing seed-colonizing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 452-460.

Morel J.L., Colin F., Germon J.C., Godin P., Juste C., 1985. Methods for the evaluation of the maturity of municipal refuse compost. In: Composting of Agricultural and Other Wastes, ed. J.K.R. Gasser. Elsevier Applied Science, New York, USA, pp. 56-72.

Nakasaka K., Hiraoka S., Nagata H., 1998. A new operation for producing disease suppressive compost from grass clippings. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 4015-4020.

Napolitano A., Lanzuise S., Ruocco M., Arlotti G., Ranieri R., Knutsen S.H., Lorito M., Fogliano V., 2006. Treatment of cereal products with a tailored preparation of *Trichoderma* enzymes increases the amount of soluble dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 7863-7869.

Nelson E.B., 1990. Exudate molecules initiating fungal responses to seed and roots. *Plant Soil* **129**: 61-73.

Nelson E.B., Hoitink H.A.J., 1982. Factors affecting suppression of *Rhizoctonia solani* in container media. *Phytopathology* **72**: 275-279.

Nelson E.B., Hoitink H.A.J., 1983a. The role of microorganisms in the suppression of *Rhizoctonia solani* in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology* **73**: 274-278.

Nelson E.B., Kuter G.A., Hoitink H.A.J., 1983b. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology* **3**: 1457-1462.

Noble R., Coventry E., 2005. Suppression of soil-borne plant diseases with composts: a review. *Biocontrol Science and Technology* **15**: 3-20.

Noble R., Roberts S.J., 2004. Eradication of plant pathogens and nematodes during composting: a review. *Plant Pathology* **53**: 548-568.

Nuntagij M., Kaemmerer J.R., Bailly L., Andre, 1990. Composés phénolique et fixation non symbiotique au cours de la biodégradation de composés lignocellulosiques. *Agrochimica* **34**: 311-319.

Otten W., Gilligan C.A., Watts C.W., Dexter A.R., Hall D., 1999. Continuity of air-filled pores and invasion thresholds for a soilborne fungal plant pathogen, *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry* **31**:1803-1810.

Papavizas G.C., 1968. Survival of root-infecting fungi in soil. IV. Effect of amendments on bean root rot caused by *Thielaviopsis basicola* and on inoculum density of the causal organism. *Phytopathology* **58**: 421-428.

Papavizas G.C., Davey C. B., 1960. *Rhizoctonia* disease of bean as affected by decomposing green plant materials and associated microfloras. *Phytopathology* **50**: 516-522.

Patrick Z.A., Toussoun T.A., 1965. Plant residues and organic amendments in relation to biological control. In: Baker F.K. and Snyder W.C. (eds) *Ecology of Soil-Borne Pathogens - Prelude to Biological Control*, pp. 440-459. University of California, Berkeley, CA, USA

Patrick Z.A., 1971. Phytotoxic substance associated with the decomposition in soil of plant residues. *Soil Science* **111**:13-18.

Pérez-Piqueres A., Edel-Hermann V., Alabouvette C., Steinberg C., 2006. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 460-470.

Peuravuori, J. & Pihlaja, K. 1998. Multi-method characterization of lake aquatic humic matter isolated with two different sorbing solids. *Analytica Chimica Acta*, **363**, 235-247.

Pharand B., Carisse O., Benhamou N., 2002. Cytological aspects of compost-mediated induced resistance against *Fusarium* crown and root rot in tomato. *Phytopathology* **92**: 424-438.

Reuveni R., Raviv M., Krasnovsky A., Freiman L., Medina S., Bar A., Orion D., 2002. Compost induces protection against *Fusarium oxysporum* in sweet basil. *Crop Protection* **21**: 583-587.

Ringer C.E., Millner P.D., Teerlinck L.M., Lyman B.W., 1997. Suppression of seedling damping-off disease in potting mix containing animal manure composts. *Compost Science Utilization* **5**: 6-14.

Roberts D.P., Lumsden R.D., 1988. Effect of hydrolytic enzymes of *Glicocladium virens* on *Pythium ultimum*. *Phytopathology* **78**:863.

Ros M., Hernandez M.T., Garcia C., Bernal A., Pascual J.A., 2005. Biopesticide effect of green compost against *Fusarium* wilt on melon plants. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 845-854.

Rosseau G.X., Riouxb S., Dostalerc D., 2006. Multivariate effects of plant canopy, soil physico-chemistry and microbiology on *Sclerotinia* stem rot of

soybean in relation to crop rotation and urban compost amendment. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 3325–3342.

Ryckeboer J., 2001. Biowaste and yard waste composts: microbiological and hygienic aspects-suppressiveness to plant diseases. Ph.D. Thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.

Said-Pullicino D., Kaiser K., Guggenberger G., Gigliotti G., 2007. Changes in the chemical composition of water-extractable organic matter during composting: Distribution between stable and labile organic matter pools. *Chemosphere* **66**: 2166–2176.

Scheuerell S., Mahaffee W., 2002. Compost tea: principles and prospect for plant disease control. *Compost Science and Utilization* **10**: 313-338.

Scheuerell S.J., Sullivan D.M., Mahaffee W.F., 2005. Suppression of seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*, *P. irregulare*, and *Rhizoctonia solani* in container media amended with a diverse range of Pacific Northwest compost sources. *Phytopathology* **95**: 306-315.

Schueler C., Biala J., Vogtmann H., 1989a. Antiphytopathogenic properties of biogenic waste compost. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **27**: 477-482.

Schüler C., Biala J., Bruns C., Gottschall R., Ahlers S., Vogtmann H., 1989. Suppression of root rot on peas, beans and beet roots caused by *Pythium*

ultimum and *Rhizoctonia solani* through the amendment of growing media with composted organic household waste. *Phytopathologische Zeitschrift* **127**:227-238.

Senesi N., 1989. “Valutazione dei reflui delle industrie olearie come ammendanti organici per il terreno” Sem. Inter. Sul trattamento delle acque reflue degli oleifici. Lecce 16-17 novembre 1989.

Serra-Wittling C., Houot S., Alabouvette C., 1996. Increased soil suppressiveness to *Fusarium* wilt of flax after addition of municipal solid waste compost. *Soil Biology and Biochemistry* **9**: 1207-1214.

Six J., Guggenberger G., Paustian K., Haumaier L., Elliott E.T., Zech W., 2001. Sources and composition of soil organic matter fractions between and within soil aggregates. *European Journal of Soil Science* **52**: 607–618.

Smoliniska U., 2000. Survival of *Sclerotium cepivorum* sclerotia and *Fusarium oxysporum* chlamydospores in soil amended with cruciferous residues. *Journal of Phytopathology* **148**: 343-349.

Spaccini R., Baiano S., Gigliotti G., Piccolo A., 2008. Molecular characterization of a compost and its water-soluble fractions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **56**:1017–1024.

Stone A.G., Scheuerell S.J., Darby H.M., 2004. Suppression of soilborne diseases in field agricultural systems. In *Soil organic matter in sustainable*

agriculture. (F. Magdoff & Weil, R. R., eds.), pp. 131- 178. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.

Stone A.G., Traina S.J., Hoitink H.A.J., 2001. Particulate organic matter composition and *Pythium* damping off of cucumber. *Soil Science Society America Journal* **65**, 761-770.

Szczecz M., Smoliniska U., 2001. Comparison of suppressiveness of vermicomposts produced from animal manures and sewage sludge against *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae*. *Journal of Phytopathology* **149**: 77-82.

Szczecz M.M., 1999. Suppressiveness of vermicompost against *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Phytopathology* **147**: 155-161.

Tam N.F.Y., Tiquia S.M., 1994. Assessing toxicity of 'spent sawdust pig-litter' using seed germination technique. *Resource, Conservation and Recycling* **11**: 261-274.

Tenuta M., Lazarovits G., 2002. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **92**: 255-264.

Termorshuizen A.J., van Rijn E., van der Gaag D.J., Alabouvette C., Chen Y., Lagerlöf J., Malandrakis A.A., Paplomatas E.J., Rämert B., Ryckeboer J., Steinberg C., Zmora-Nahum S., 2007. Suppressiveness of 18 composts

against 7 pathosystems: Variability in pathogen response. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 2461-2477.

Theodore M., Toribio V., 1995. Suppression of *Pythium aphanidermatum* in composts prepared from sugarcane factory residues. *Plant Soil* **177**: 219-223.

Tilston E.L., Pitt D., Groenhof A.C., 2002. Composted recycled organic matter suppresses soil-borne diseases of field crops. *New Phytologist* **154**: 731-740.

Tuitert G., Szczach M., Bollen G.J., 1998. Suppression of *Rhizoctonia solani* in potting mixtures amended with compost made from organic household waste. *Phytopathology* **88**: 764-773.

Vallini G., Orselli R., 1987. “Smaltimento e riciclaggio dei fanghi di conceria al tannino vegetale con il metodo del compostaggio in cumuli statici” In: C.M.C. **63**: 33-35.

Vallini G., 1995. Voce “Compost” (pp. 173-174). In: Dizionario dell’Ambiente (a cura di G. Gamba e G. Martinetti), ISEDI/ Utet Libreria, Torino.

van der Gaag D.J., van Noort F.R., Stapel-Cuijpers L.H.M., de Kreij C., Termorshuizen A.J., van Rijn E., Zmora-Nahum S., Chen. Y., 2007. The use of green waste compost in peat-based potting mixtures: Fertilization and

suppressiveness against soilborne diseases. *Scientia Horticulturae* **114**: 289–297

van Os G.J., van Ginkel J.H., 2001. Suppression of *Pythium* root rot in bulbous iris in relation to biomass and activity of the soil microflora. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1447-1454.

Veeken A.H.M., Blok W.J., Curci F., Coenen G.C.M., Temorshuizen A.J., Hamelers H.V.M., 2005. Improving quality of composted biowaste to enhance disease suppressiveness of compost-amended, peat based potting mixes. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 2131-2140.

Viana F.M.P., Kobori R.F., Bettiol W., Athayde-Sobrinho C., 2000. Control of damping off in bean plant caused by *Sclerotinia sclerotiorum* by the incorporation of organic matter in the substrate. *Summa Phytopathologica* **26**: 94–97.

Viterbo A., Ramot O., Chernin L. e Chet I. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma spp.* In: the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:549-556

Wang S.L., Yieh T.C., Shih I.L., 1999. Production of antifungal compounds by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme and Microbial Technology* **25**: 142–148.

Weller D.M., Raaijmakers J.M., Gardener B.B.M., Thomashow L.S., 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 309-348.

Whipps J.M., 1997. development in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* **26**: 1-84.

Widmer T.L., Graham J.H., Mitchell D.J., 1998. Composted municipal waste reduces infection of citrus seedlings by *Phytophthora nicotianae*. *Plant Disease* **82**: 683-688.

Wong M.H., 1985. Effects of animal manure composts on tree (*Acacia confusa*) seedling growth. *Agricultural Wastes* **13**: 261-272.

Wong M.H., Cheung Y.H., Cheung C.L., 1983. The effects of ammonia and ethylene oxide in animal manure and sewage sludge on seed germination and root elongation of *Brassica parachinensis*. *Environmental Pollution* **30**: 109-123.

Ye S.F., Yu J.Q., Peng J.H., Zheng J.H., Zou L.Y., 2004. Incidence of *Fusarium* wilt in *Cucumis sativus* L. is promoted by cinnamic acid, an autotoxin in root exudates. *Plant and Soil* **263**: 143-150.

Yulianti T., Sivasithamparam K., Turner D.W., 2006. Saprophytic growth of *Rhizoctonia solani* Kühn AG2-1 (ZG5) in soil amended with fresh green

manures affects the severity of damping-off in canola. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 923–930.

Zeilinger S., Galhaup C., Payer K., Woo S.L., Mach R.L., Fekete C., Lorito M., Kubicek C. P., 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genetics and Biology* **26**: 131-140.

Zhang W., Dick W.A., Hoitink H.A.J., 1996. Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. *Phytopathology* **86**: 1066-1070.

Zucconi F., Forte M., Monaco A., De Bertoldi M., 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* **22**: 54-57.

Zucconi, F. 1996. Declino del Suolo e Stanchezza del Terreno. Spazio Verde, Padova, Italy.

Università degli Studi di Napoli “Federico II”.
Dottorato di Ricerca in Agrobiologia ed Agrochimica – XXI ciclo.

Sede di svolgimento: Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale
– Facoltà di Agraria.

Tesi sperimentale di Dottorato.
Titolo: Uso di torbe e compost per il contenimento delle malattie telluriche.

Parole chiave: Soppressività, BiologTM, ¹³C CPMAS NMR.

Autore: Dott. Catello Pane.
Tutor: Prof. Felice Scala.
Coordinatore: Prof. Matteo Lorito.

Depositato presso l’archivio digitale www.fedoatd.unina.it

- Stampato Novembre 2008 -